

*Aus dem Institut für Pharmakologie
Direktor: Prof. Dr. med. Robert Grosse
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit der CSL Behring GmbH in Marburg*

Untersuchungen zur pharmakologischen Charakterisierung von Gerinnungsfaktor XIIa-Inhibitoren



*Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizinwissenschaften*

Vorgelegt von Marion Fries, geb. Hofmeister
aus Wuppertal
Marburg, 2015

Success is not final, failure is not fatal: it is the courage to continue that counts.

Winston Churchill

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 10. April 2015.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. G. Dickneite

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. C. Kleinschnitz

Die vorliegende Arbeit wurde bei der CSL Behring GmbH in Marburg/Lahn in dem Zeitraum von Februar 2011 bis Januar 2014 in der Abteilung Pharmakologie/Toxikologie, Preclinical R&D unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Marc Nolte, PhD, und Dr. Frauke May sowie unter der Direktion von Herrn Dr. Ingo Pragst und Herrn Prof. Dr. Gerhard Dickneite angefertigt.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen und Einheiten.....	IV
I. Abkürzungen	IV
II. Einheiten	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Übersicht	1
1.2 Das Blutgerinnungssystem	5
1.2.1 Primäre Hämostase	6
1.2.2 Sekundäre Hämostase	7
1.2.3 Regulationsmechanismen	11
1.3 Das Kontaktphasensystem	13
1.3.1 Faktor XII	13
1.3.2 Weitere Faktoren des Kontaktphasensystems	21
1.4 Thrombotische Hämostasestörungen	24
1.4.1 Thrombosen und Folgeerkrankungen	24
1.4.2 Kontaktphasen-Aktivierung in Systemen der extrakorporalen Zirkulation	28
1.5 Der ischämische Schlaganfall	33
1.5.1 Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls	35
1.5.2 Behandlungsoptionen des ischämischen Schlaganfalls	36
1.6 FXIIa-Inhibitoren	38
1.6.1 In der Literatur beschriebene Faktor XII-Inhibitoren	38
1.6.2 Spezifische FXIIa-Inhibitoren der Arbeitsgruppe	40
1.6.3 Vorarbeiten zur pharmakologischen FXIIa-Inhibition	41
2. ZIEL DER ARBEIT	44
3. MATERIAL UND METHODEN	45
3.1 Übersicht über alle Studien dieser Arbeit	45
3.2 Thrombosemodelle in der Maus	46
3.2.1 Aortenkompressionsmodell	48
3.2.2 Venöses Thrombosemodell	50
3.2.3 Arteriovenöses Shunt Modell	52
3.3 Thrombosemodelle im Kaninchen	54
3.3.1 Simultanes arterielles und venöses Thrombosemodell	56
3.3.2 Arteriovenöses Shunt-Modell	58

3.4	Blutungstests und Clot-Retraktionstest im Kaninchen	60
3.4.1	Ohrblutungszeit.....	60
3.4.2	Nierenblutungstest.....	60
3.4.3	Clot-Retraktionstest	61
3.5	Das murine Schlaganfallmodell (tMCAO).....	63
3.5.1	Operationstechnik.....	64
3.5.2	Neurofunktionelle Verhaltensuntersuchungen	66
3.5.3	Histochemische Infarkt volumenbestimmung	68
3.5.4	Fibrin(-ogen)-Bestimmung mittels Western Blot	70
3.5.5	MRNA-Expressions-Bestimmung über die quantitative Echtzeit-Polymerase- Kettenreaktion	76
3.6	Blut- und Plasmatests.....	83
3.6.1	Glas-induzierte Gerinnungszeit von Vollblut (WBCT)	83
3.6.2	Aktivierter Partielle Thromboplastinzeit (aPTT)	83
3.6.3	Prothrombinzeit (PT)	84
3.6.4	FXIIa-Aktivitätstest	84
3.6.5	Differentialblutbild	85
3.7	Statistische Methoden	85
4.	ERGEBNISSE.....	87
4.1	Wirksamkeit der FXIIa-Inhibition in murinen Thrombosemodellen	87
4.1.1	Aortenkompressionsmodell	87
4.1.2	Venöses Thrombosemodell.....	89
4.1.3	Arteriovenöses Shunt Modell in der Maus	91
4.1.4	Erkenntnisse aus den Thrombose-Studien in Mäusen.....	95
4.2	Wirksamkeit der FXIIa-Inhibition in Thrombosemodellen im Kaninchen	97
4.2.1	Simultane arterielle und venöse Thrombose	97
4.2.2	Arteriovenöses Shunt-Modell im Kaninchen	102
4.2.3	Der Clot-Retraktionstest.....	105
4.2.4	Erkenntnisse aus den Thrombosestudien im Kaninchen	107
4.3	Wirksamkeit der FXIIa-Inhibitoren im murinen Schlaganfallmodell	108
4.3.1	Prophylaktische Behandlung mit dem anti-FXIIa MAb 3F7 (10 und 25 mg/kg)	109
4.3.2	Prophylaktische Behandlung mit dem anti-FXIIa MAb 3F7 (50 mg/kg)	124
4.3.3	Therapeutische Behandlung mit rHA-Infestin-4 (200 mg/kg)	127
4.3.4	Erkenntnisse aus den Studien des murinen Schlaganfallmodells	137
5.	DISKUSSION.....	138
5.1	FXIIa-Inhibition in der arteriellen Thrombose.....	139

5.2	FXIIa-Inhibition in der venösen Thrombose	143
5.3	FXIIa-Inhibition bei Kontaktaktivierung an Fremdoberflächen	148
5.4	FXIIa-Inhibition im experimentellen Schlaganfall.....	152
5.5	Ausblick	163
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	169
6.1	Summary	170
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	171
8.	ANHANG.....	IX
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	IX
8.2	Publikationsliste	X
8.3	Danksagung	XI
8.4	Eidesstattliche Erklärung.....	XII
8.5	Akademische Lehrer	XII
8.6	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN

I. Abkürzungen

a	Aktivierte Form der Gerinnungsfaktoren
A.	<i>Arteria</i>
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
AU	<i>Arbitrary Units</i>
A/V	Arteriovenös
Aa.	<i>Arteriae, Pl.</i>
ABB.	Abbildung
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
APC	Aktiviertes Protein C
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
aPTT	Aktivierte Partielle Prothrombinzeit
AT	Antithrombin
ATP	Adenosintriphosphat
B1-R	Bradykinin-Rezeptor 1
B2-R	Bradykinin-Rezeptor 2
BCA	Bicinchoninsäure
BG	Basalganglien
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BK	Bradykinin
Bzw.	Beziehungsweise
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
Ca	Kalzium
CCA	<i>A. carotis communis</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHB	Chinchilla Bastard
CK-1	Cytokeratin-1
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
COU-254	3-Carboxamid-Coumarin
C _T	Schwellenwert der fraktionellen Zykluszahl

CX	<i>Cortex</i>
DEPC	Diethyldicarbonat
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DIC	<i>Disseminated intravascular coagulation</i>
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECA	<i>A. carotis externa</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
ECMO	<i>Extracorporeal Membran Oxygenation</i>
Edn-1	Endothelin-1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
FeCl ₃	Eisen-III-Chlorid
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	<i>Colony-stimulating factor</i>
gC1qR	Globulärer C1q-Rezeptor
GP	Glykoprotein
GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde / <i>Society of Laboratory Animals</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAE	<i>Hereditary angioedema</i>
Hg	Quecksilber
HGFA	<i>Hepatic growth faktor activator</i>
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HK	Hochmolekulares Kininogen
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HRG	Histidin-reiches Glycoprotein
ICA	<i>A. carotis interna</i>
ICH	<i>Intracerebral hemorrhage</i>
IgG	Immunglobulin G
IL-1β	Interleukin-1β
INH	Inhibitor
i.p.	Intraperitoneal
Ir-CPI	<i>Recombinant Ixodes ricinus Contact Phase Inhibitor</i>
i.v.	Intravenös

K _i	Dissoziationskonstante
KK	Kallikrein
KKS	Kallikrein-Kinin-System
K.O.	<i>Knock-out</i>
KPS	Kontaktphasensystem
LPS	Lipopolysaccharid
MAb	<i>Monoclonal antibody</i>
MCA	<i>Middle cerebral artery</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMP	Matrixmetalloproteinase
MRI	Magnet-Resonanz-Imaging
mRNA	<i>Messenger Ribonuclein Acid</i>
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NMH	Niedermolekulares Heparin
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCA	<i>A. pterygopalatina</i>
PCK	D-Pro-Phe-Arg Chloromethylketon
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PF-3	Plättchenfaktor 3
Prä-KK	Prä-Kallikrein
Poly-P	Polyphosphate
PPP	<i>Platelet poor plasma</i>
PRP	<i>Platelet rich plasma</i>
PT	Prothrombinzeit
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAS	Renin-Angiotensin-System
Rel.	Relativ
rHA	Rekombinantes Humanalbumin
rHA-INF-4	rHA-Infestin-4
RI	<i>Reperfusion Injury</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RQ	Relative Quantität

RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
rt-PA	Rekombinanter Gewebs-Plasminogen-Aktivator
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SHP	Standard-Humanplasma
TAFI	Thrombin-aktivierter Fibrinolyse-Inhibitor
TAT	Thrombin-Antithrombin-Komplex
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TF	<i>Tissue Factor</i>
TFPI	<i>Tissue Factor Pathway Inhibitor</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TIA	Transiente ischämische Attacke
tMCAO	<i>Transient Middle Cerebral Artery Occlusion</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
t-PA	<i>Tissue Plasminogen Activator</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
u-PA	Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator
u-PAR	Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator-Rezeptor
V.	<i>Vena</i>
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WHO	<i>World Health Organisation</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

II. Einheiten

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Ampere
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung; $9,81 \cdot \text{m/sec}$
h	Stunde
Da	Dalton
L	Liter
m	Meter
M	Molar
min	Minute
mm ³	Kubikmillimeter
n	Anzahl
sec	Sekunde
U	Unit; Einheit
V	Volt
vol/vol	Volumenprozent

Präfixe

k	Kilo
c	Centi
m	Milli
μ	Mikro
n	Nano
p	Piko

1. EINLEITUNG

1.1 Übersicht

Im gesunden menschlichen Organismus ist die Blutgerinnung ein komplexes, gut ausbalanciertes System. Es besteht aus Interaktionen zwischen dem Endothel der Blutgefäße, plasmatischer Proteine sowie der zellulären Blutbestandteile [Mann KG 2003; Monroe DM et al. 2006; Triplett DA 2000]. Dabei wirken Blutstillung (Hämostase) und Thrombusbildung synergen einem Blutverlust nach einer Gefäßverletzung entgegen. Die Hämostase dient dem Schutz des Gefäßsystems nach einer Verletzung und erhält die Fluidität des Blutes. Durch die Thrombusbildung werden akute Verletzungen der Gefäßwand verschlossen und der Heilungsprozess initiiert. Eine Fehlregulation des Systems zerstört das empfindliche Gleichgewicht und es kommt entweder zu einer Thromboseneigung oder einer Blutungsneigung. Die Ursachen hierfür können angeboren sein, beispielsweise bei Genmutationen, die zu nicht oder beschränkt funktionellen Plasmaproteinen führen. Eine Fehlregulation kann auch im Rahmen von Erkrankungen erworben sein. Zum Beispiel entwickeln Herzinfarkt-Patienten eine Thromboseneigung, oder eine therapeutische Antikoagulation zur Prävention thrombo-embolischer Erkrankungen erhöht das Risiko von Blutungsereignissen.

Generell wird außerdem zwischen venösen und arteriellen thrombotischen Erkrankungen unterschieden. Venöse Thrombosen entstehen durch Blutstase und führen im venösen Niederdrucksystem unter anderem zum Krankheitsbild der tiefen Beinvenenthrombose. Daher bestehen venöse Thromben hauptsächlich aus Erythrozyten und Fibrin. Wenn sich thrombotisches Material vom Ursprungs-ort in der Vene löst und durch den Blutdruck in die Lunge gepumpt wird, kann eine Lungenembolie die Folge sein. Zur Vorbeugung einer venösen Thrombose wird niedermolekulares Heparin verabreicht, was außerdem zur Prophylaxe einer potenziellen Lungenembolie angewandt werden kann [Konstantinidis S 2006].

Anders als im venösen System herrscht im arteriellen System eine hohe Flussrate. Dadurch ist die Bindung der Koagulationsfaktoren an Oberflächen notwendig, um auch unter hohen Scherkräften eine Koagulation zu gewährleisten. Die häufigste Ursache für eine arterielle Thrombose sind arteriosklerotische Veränderungen der Gefäßinnenwand, auch als Plaque bezeichnet. Die hohen Scherkräfte begünstigen eine Ablösung von Plaque-Material, wodurch die geschädigte Gefäßwand mit einem großen thrombotischen Potenzial dem Blutstrom exponiert wird. Eine lokale Thrombose kann zur

Okklusion des Gefäßes führen. Darüber hinaus wird eine Embolisierung des Gerinnsels durch die arteriellen Scherkräfte begünstigt. Ein Embolus okkludiert kleinere Gefäße im Endstromgebiet, was zu einer Minderperfusion oder Ischämie führen kann. Typische Beispiele hierfür sind der akute Myokardinfarkt oder der ischämische Schlaganfall.

Patienten mit erhöhter Thromboseneigung werden prophylaktisch mit Antikoagulanzen behandelt, um einer pathologischen Koagulation vorzubeugen. Dadurch wird jedoch das Gleichgewicht des Gerinnungssystems in Richtung einer Blutungsneigung verschoben, was ebenfalls lebensbedrohliche Auswirkungen haben kann. In einem klinischen Notfall stellt jedoch die sichere Antagonisation der therapeutischen Antikoagulanzen wie Plättchen- oder Vitamin K-Inhibitoren eine Herausforderung dar.

Der Einsatz eines kardiopulmonalen Bypasses erfordert ebenfalls eine massive Antikoagulation, die meist mittels Heparin erfolgt. Das Blut gerät in diesem extrakorporalen Pumpsystem mit fremden Oberflächen in Kontakt. Dadurch wird über die Aktivierung des Kontaktphasensystems (KPS) die Koagulationskaskade eingeleitet (Kap. 1.2). Die Antikoagulation mit Heparin verhindert eine Thrombusbildung durch die Fremdoberflächen. Als Nebenwirkung tritt durch die gestörte Hämostase jedoch eine Blutungsneigung auf, was besonders während des chirurgischen Eingriffs zu Blutverlusten führen kann. Die Heparinwirkung kann mit der Substanz Protamin antagonisiert werden. Dennoch kommt es oft zu hämorrhagischen Komplikationen [DeLaria GA et al. 1994].

Derzeit gilt, dass eine Behandlung mit Antikoagulanzen stets eine erhöhte Blutungsneigung mit sich bringt, da auch die physiologische Blutstillung beeinträchtigt wird. Für Patienten mit Thromboseprophylaxe bedeutet dies zum Einen den lebenswichtigen Schutz vor thrombotischen Ereignissen wie Myokardinfarkt oder Schlaganfall, bzw. deren Rezidiv. Andererseits kann eine Verletzung oder eine Notfall-Operation durch eine bestehende Antikoagulation ein lebensbedrohliches Blutungsrisiko bergen. Darüber hinaus entwickeln einige Patienten unter Thromboseprophylaxe Spontanblutungen ohne von außen erkennbare Ursachen [Mittal MK et al. 2012].

Angesichts der beschriebenen Komplikationen besteht in der Klinik der dringende Bedarf für neue und effektive Antikoagulanzen mit einem reduzierten Blutungsrisiko [Kozłowski D et al. 2013]. Aktuelle Forschungsvorhaben arbeiten mit Hochdruck an dieser Fragestellung, um eine sicherere Behandlung ohne Blutungskomplikationen zu ermöglichen. Ein aktueller Ansatz zur Bewältigung dieser Herausforderung ist die Hemmung des Koagulationsfaktor XII (FXII). Als Schlüsselfaktor des

intrinsischen Koagulationsweges mündet seine Aktivierung in der Bildung von Thrombin und schließlich Fibrin [Renné T et al. 2012].

Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass eine FXIIa-Defizienz in Mäusen vor einer Thrombose unter arteriellen Flussbedingungen schützt, ohne die physiologische Hämostase zu beeinträchtigen [Renné T et al. 2005]. Diese Beobachtung konnte außerdem mit dem spezifischen FXIIa-Inhibitor rHA-Infestin-4 *in vivo* im Nagermodell bestätigt werden [Hagedorn I et al. 2010]. Für die Planung klinischer Studien wird derzeit in Tiermodellen erforscht, ob ein spezifischer FXIIa-Inhibitor die pathologische Thrombusbildung auch im Menschen unterbinden kann, ohne eine erhöhte Blutungsneigung hervorzurufen. Darüber hinaus wurde vor Kurzem ein protektiver, antithrombotischer Effekt durch eine pharmakologische FXIIa-Inhibition beim Einsatz extrakorporalen Membran-Oxygenierung (ECMO) demonstriert [Larsson M et al. 2014].

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zwei spezifische FXIIa-Inhibitoren auf ihre antithrombotische Wirksamkeit in verschiedenen Thrombosemodellen und im Modell des ischämischen Schlaganfalls untersucht. Durchgeführt wurden die Studien in den Spezies Maus und Kaninchen, wobei die Thrombose jeweils auf unterschiedliche Arten induziert wurde. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die FXIIa-INH außerdem in einem murinen experimentellen Schlaganfallmodell getestet. Durch eine zerebrale Ischämie entsteht ein nekrotischer Infarktkern aus unterversorgtem Nervengewebe. Die Zone unmittelbar um den Infarktkern reagiert auf die verminderte Blutversorgung und den nekrotischen Zelluntergang im benachbarten Gewebe mit der Einleitung pathophysiologischer Prozesse. Diese beinhalten unter anderem pro-inflammatorische und prokoagulative Signale. Eine Reperfusion des geschädigten Gewebes stellt zwar einerseits die Nährstoffversorgung wieder her, andererseits fördert sie paradoxerweise die Verschlechterung der klinischen Symptome. Dies wird als „*Reperfusion Injury*“ (RI) bezeichnet. Eine Rolle hierbei spielt die lokale Einleitung der Koagulationskaskade, durch die Mikrothromben sekundär eine Reperfusion unterbinden [Dalkara T et al. 2012; Gursoy-Ozdemir Y et al. 2012; Pham M et al. 2010].

Das Schlaganfallmodell wurde mit dem Hintergrund ausgewählt, dass die Inzidenz von Schlaganfällen und die dadurch bedingte Mortalität in den Industrienationen steigen. In Deutschland erleiden jedes Jahr 350 Patienten pro 100.000 Einwohner einen ersten Schlaganfall [Zhang Y et al. 2012]. Unter anderem resultiert dieser Trend aus der alternden Bevölkerung, obwohl die Behandlungsmöglichkeiten von Schlaganfallpatienten beständig verbessert werden [Zhang Y et al. 2012]. Nach dem Myokardinfarkt und Krebserkrankungen steht der Schlaganfall auf Platz drei der häufigsten Todesursachen

und ist außerdem die häufigste Ursache für eine im Erwachsenenalter erworbene schwere Behinderung [Saw J 2014]. Dabei werden laut *American Heart Association* etwa 87 % der Schlaganfälle durch eine Thromboembolie verursacht.

Therapeutisch besteht die Möglichkeit, ein Gerinnsel mechanisch oder pharmakologisch mit der einzig zugelassenen Substanz rekombinanter Gewebs-Plasminogenaktivator (rt-PA) zu lysieren. Jedoch ist die sichere Anwendung des rt-PA auf einen Zeitraum von maximal 4,5 h nach Auftreten der Schlaganfall-Symptomatik begrenzt. Zeitlich verzögerte Therapieversuche sind mit einem erhöhten Risiko von intrazerebralen Hämorrhagien (ICH) verbunden, die dann wiederum schwere Schäden des zentralen Nervensystems (ZNS) zur Folge haben können [del Zoppo GJ et al. 2013]. Durch das enge therapeutische Fenster erhalten etwa 99 % der Patienten keine Lysetherapie [Huang J et al. 2006].

Aber auch eine Lysetherapie besitzt nicht das Potenzial, die Folgen des ischämischen Schlaganfalls zu reversieren, sondern verhindert die progressive Ausbreitung des Infarktkerns. Zurzeit existiert keine Möglichkeit die Schäden eines Schlaganfalls zu heilen, daher werden Patienten ausschließlich Symptom-fokussiert behandelt. Folglich ist der medizinische Bedarf für neuartige Therapieoptionen zur Prävention und zur Behandlung eines ischämischen Schlaganfalls groß.

Ein idealer Behandlungsansatz sollte eine Thromboembolie-Prophylaxe zum Schutz vor der Entstehung einer Ischämie bieten. Weiterhin sollte er die Infarktausbreitung verhindern, ohne Blutungskomplikationen hervorzurufen. Aktuelle präklinische Untersuchungen deuten darauf hin, dass eine pharmakologische Hemmung des FXIIa als antithrombotisches Target eine aussichtsreiche neuartige Therapieoption darstellt. Diese Annahme ist darin begründet, dass in FXII-defizienten Patienten ein Mangel an FXII nicht mit Blutungskomplikationen assoziiert wird [Ratnoff OD et al. 1955].

Aktuelle Studien mit FXII-defizienten Mäusen in einem experimentellen Schlaganfall-Modell konnten zeigen, dass die Abwesenheit von plasmatischem FXII zu einer Verbesserung der klinischen Defizite und eine verringerte Infarktausbreitung führt [Kleinschnitz C et al. 2006]. In dem Modell wurde durch den transienten Verschluss der *Arteria (A.) cerebri media* eine Ischämie herbeigeführt. Das Modell ist auch bekannt unter der Bezeichnung tMCAO („*transient middle cerebral artery occlusion*“).

Unterstützend konnte von Hagedorn et al. eine vergleichbare protektive Wirksamkeit durch eine pharmakologische FXIIa-Inhibition mittels rHA-Infestin-4 im tMCAO-Modell demonstriert werden [Hagedorn I et al. 2010]. Darauf basierend wurde im Rahmen dieser Arbeit ein rekombinanter humaner anti-FXIIa Antikörper in einem prophylaktischen Behandlungsansatz auf seine Effizienz untersucht. Ergänzend zum prophylaktischen Behandlungsansatz der Studie von Hagedorn et al.

wurde in der vorliegenden Arbeit rHA-Infestin-4 im tMCAO-Modell mit einem therapeutischen Behandlungsansatz überprüft.

1.2 Das Blutgerinnungssystem

Das Blutgerinnungssystem dient der Blutstillung und der Einleitung der Wundheilung bei einer Gefäßverletzung. Es wird unterteilt in eine primäre und eine sekundäre Hämostase, die ineinander übergreifen. Die wichtigsten Komponenten der Hämostase sind Thrombozyten, plasmatische Gerinnungsfaktoren und das Gefäßendothel. Die primäre Hämostase basiert auf der Aktivierung von Thrombozyten unmittelbar nach einer Verletzung. Nur wenig später wird der Blutverlust weiter durch eine Vasokonstriktion des Endothels minimiert (Kap. 1.2.1).

Die sekundäre Hämostase (Koagulation) wird getragen durch die Aktivierung der plasmatischen Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten. Dabei bilden aktivierte Thrombozyten mit Erythrozyten und Leukozyten die zelluläre Grundlage eines Gerinnsels. Im Zuge der plasmatischen Gerinnungsreaktion entstehen Fibrinfäden zur Stabilisierung des Gerinnsels (Thrombus). Die Unterteilung in primäre und sekundäre Hämostase dient dem besseren Verständnis, aber physiologisch verlaufen beide Prozesse nahezu synchron.

Traditionell werden die Abläufe der Koagulation durch ein kaskadenförmiges Schema dargestellt, bei dem die einzelnen Faktoren einander durch proteolytische Spaltung aktivieren (Abbildung 1). Es bestehen auf allen Ebenen Quervernetzungen, die die Teilsysteme untereinander ergänzen und / oder regulieren. Zum erleichterten Verständnis werden die plasmatischen Prozesse der Koagulation in den extrinsische und intrinsischen Weg untergliedert. Beide Wege enden gemeinsam in der Bildung von aktivierten Faktor X (FXa) und letztendlich Thrombin. Parallel zum Ablauf der Gerinnungsmechanismen verhindert das fibrinolytische System einen Gefäßverschluss durch eine überschießende Thrombusbildung (s. Kap. 1.2.3). Die Thrombose beschreibt eine pathologische Gerinnselbildung innerhalb eines Gefäßes, die klinisch unerwünscht ist und schwerwiegende Folgen für den Patienten haben kann. Die Thrombose entsteht entsprechend der Virchow-Trias meist auf der Grundlage einer entzündlichen Veränderung des Gefäßendothels, einer verminderten Blutfließgeschwindigkeit und einer veränderten Zusammensetzung des Blutes (Kap. 1.4.1).

1.2.1 Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase ist eine unmittelbare Reaktion auf eine Gefäßverletzung. Eine Vasokonstriktion der glatten Muskelzellen drosselt den Austritt von Blut aus der Wunde. Gleichzeitig adhären Thrombozyten aus dem Blut am geschädigten Endothel, um den Blutverlust gering zu halten und das Eindringen von Keimen in die Blutbahn zu verhindern. Die Adhäsion erfolgt über verletzungsbedingt freiliegende Proteine der subendothelialen Matrix, wie zum Beispiel Kollagen, Fibronectin und Laminin. Der plasmatische von-Willebrand-Faktor (vWF) bindet an das freiliegenden Kollagen und vermittelt eine noch reversible Bindung der Thrombozyten über den thrombozytären Rezeptorkomplex aus den Glykoproteinen (GP) Ib-V-IX. Die feste Bindung der Thrombozyten erfolgt im nächsten Schritt über die Verlinkung zwischen GPIIb/IIIa und dem Kollagenrezeptor. Diese Bindung aktiviert die Thrombozyten, sodass sie weitere thrombozytäre Agonisten wie Thromboxan A₂ und ADP sezernieren [Nieswandt B et al. 2011]. Aktivierte Thrombozyten unterstützen die Propagation der Koagulation, indem sie weiteren vWF und andere thrombogene Faktoren (u. a. Thromboxan A₂, ADP und Serotonin) aus ihren Granula ausschütten [Jurk S et al. 2003; Koutts J et al. 1978]. Dies fördert die Aggregation weiterer Thrombozyten aus dem Blutstrom an den primären Thrombus, vermittelt durch Adhäsionsrezeptoren auf der thrombozytären Oberfläche. Des Weiteren exprimieren die aggregierten Plättchen Phospholipide auf ihrer Oberfläche (z. B. Plättchenfaktor 3; PF-3), die durch ihre negative Ladung eine optimale katalytische Oberfläche zur Anlagerung der Gerinnungsfaktorenkomplexe bieten (Kap. 1.2.2). Die einzelnen Plättchen werden durch ihre aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptoren miteinander vernetzt, was über Fibrin und in geringerem Ausmaß auch über vWF vermittelt wird [Gawaz MP et al. 1991].

Besonders wichtig ist dieser Mechanismus zur Ausbildung eines Aggregates im arteriellen Hochdrucksystem mit hohem Strömungswiderstand. Die Belastbarkeit des Plättchen-Aggregats ist jedoch begrenzt und weitere Prozesse sind erforderlich, um einen stabilen Thrombus zu erzeugen. Hierfür ist die Induzierung der plasmatischen Koagulation (sekundäre Hämostase) essenziell (s. Kap. 1.2.2), in deren Verlauf die Fibrinmoleküle polymerisiert und quervernetzt werden. Auf diese Weise entsteht innerhalb weniger Minuten ein stabiler Thrombus, der den Blutverlust gering hält und das Eindringen von Keimen verhindert.

1.2.2 Sekundäre Hämostase

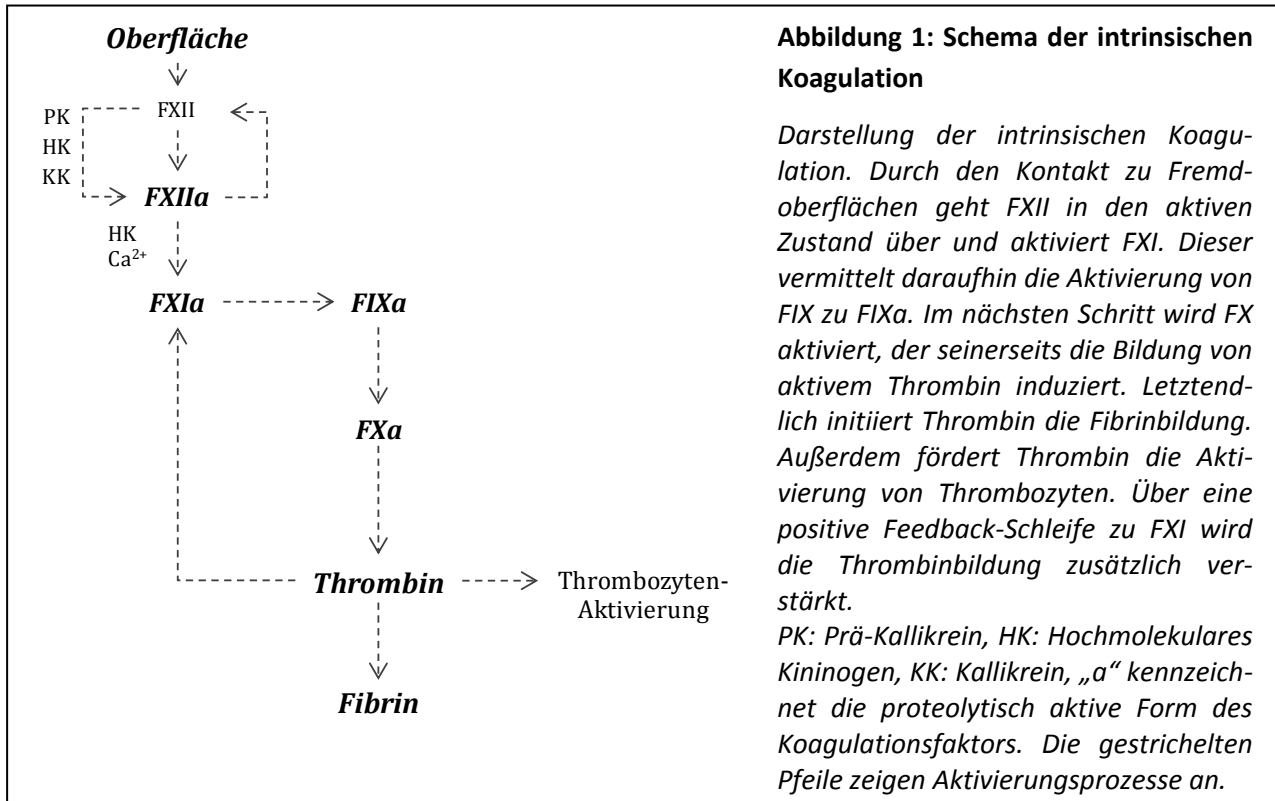
Das plasmatische Gerinnungssystem wird in den intrinsischen und den extrinsischen Weg unterteilt. Beide Wege interagieren bei der Bildung eines Gerinnsels eng miteinander und münden gemeinsam in der Bildung von Thrombin, welches die Fibrinbildung induziert. Die im Folgenden beschriebenen Aktivierungsprozesse finden unter physiologischen Bedingungen größtenteils an Oberflächen gebunden statt. Dadurch kommt es einerseits zu einer lokalen Konzentration aller beteiligten Faktoren und andererseits werden die proteolytischen Prozesse um ein Vielfaches beschleunigt. Die Oberflächenbindung begünstigt eine lokale Ankonzentrierung zur Begrenzung der Gerinnungsprozesse auf das verletzte Gewebe. Außerdem bewirkt die Oberflächenbindung bei den Faktoren XII, XI und prä-Kallikrein (KK) eine Voraktivierungsstufe durch eine Konformationsänderung.

Intrinsischer Weg

Derzeit gilt die FXIIa-vermittelte Einleitung des intrinsischen Weges als unbedeutend für die physiologische Gerinnung, da ein Mangel des initiierenden FXII nicht zu einem hämophilen Phänotyp führt. Außer FXII wird FXI dem intrinsischen Weg der Koagulation zugeschrieben. Die intrinsische Gerinnung wird eingeleitet, indem FXII an eine Oberfläche mit negativer Ladung bindet, z. B. Kollagen, thrombozytäre Polyphosphate (Poly-P), *Neutrophil extracellular traps* (NETs) oder Fremdoberflächen [Fuchs TA et al. 2010; Müller F et al. 2009]. Durch die Bindung wird FXII zur aktiven Protease FXIIa, deren Substrate FXI und prä-Kallikrein (KK) sind. Eine Feedbackschleife über die prä-KK-Aktivierung zu KK amplifiziert die FXII-Aktivierung (Kap. 1.2.1).

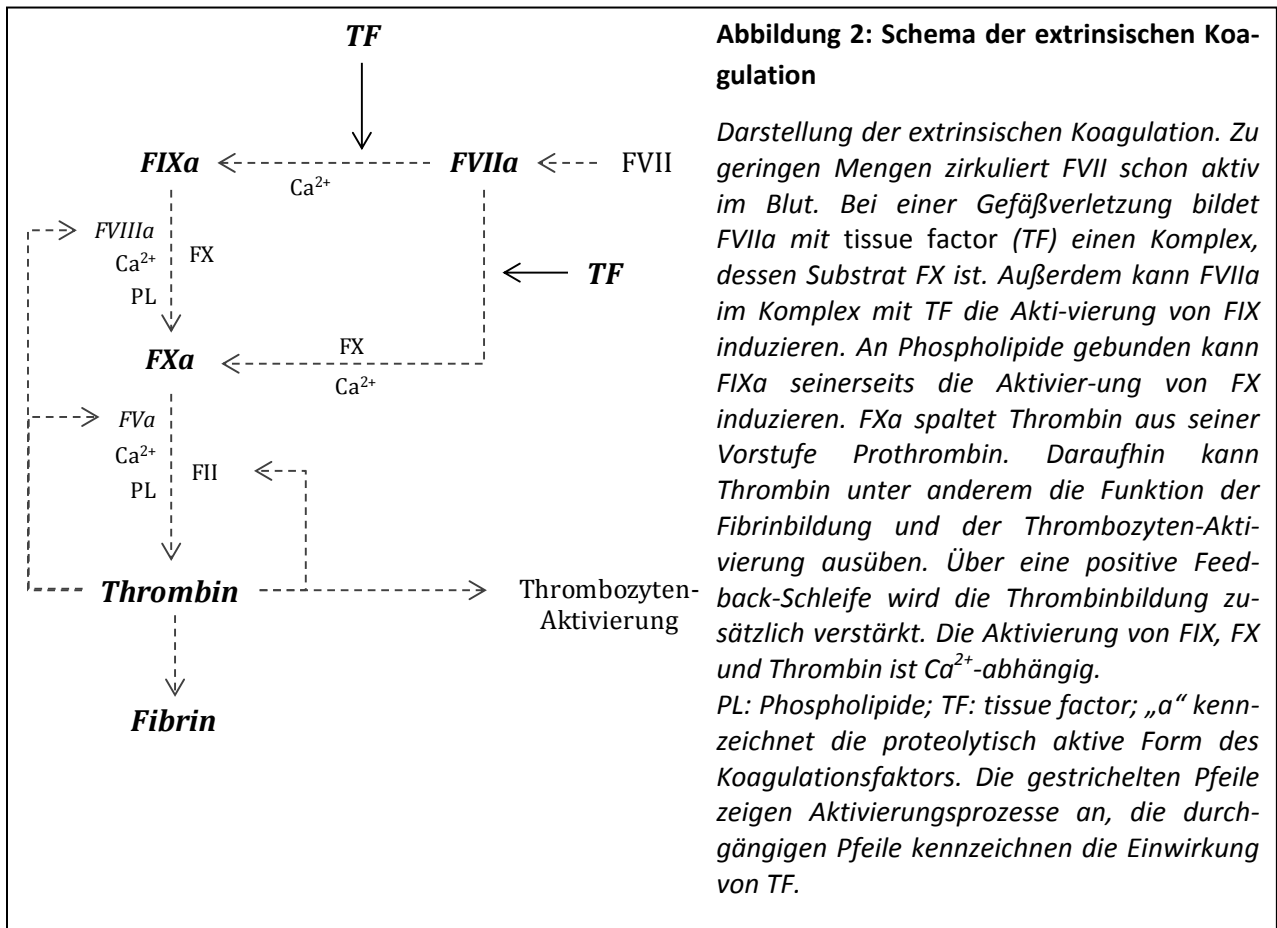
Die sukzessive Aktivierung von FXI induziert die plasmatische Koagulation, die sich kaskadenartig fortsetzt in der Aktivierung des Tenase-Komplexes aus FIX und FVIII, was letztendlich im gemeinsamen Endstück der Gerinnungskaskade durch Aktivierung von FX, FV, FII und FI mündet (Abbildung 1). Durch Rückkopplungsmechanismen werden nicht nur die lokalen Gerinnungsreaktionen amplifiziert, sondern gleichzeitig auch regulierende Inhibitoren aktiviert (Kap. 1.2.3). Die Proteine FXII, FXI, prä-KK und HK werden zusammen auch als Kontaktphasensystem (KPS) bezeichnet, da ihre Aktivierung durch Kontakt zu Fremdoberflächen induziert wird. Das KPS schließt sowohl die koagulatorische Funktion als auch eine pro-inflammatorische Funktion von FXIIa mit ein. Die letztere wird vermittelt über die FXIIa-induzierte Kallikrein-Bildung, die zur Freisetzung von Bradykinin (BK) führt [Colman RW et al. 1997]. BK ist ein potenter pro-inflammatorischer Mediator mit vasodilatatorischen Eigen-

schaften. Die einzelnen Funktionen von FXII sind ein maßgeblicher Teil dieser Arbeit, daher werden sie in Kap. 1.3 detailliert besprochen.



Extrinsischer Weg

Dem extrinsischen Weg werden die Koagulationsfaktoren FVII, FX, FV, FII und FI zugeordnet, wobei nur FVII ausschließlich zu diesem Aktivierungspfad gehört. Die Aktivierung des extrinsischen Weges beginnt mit der Freisetzung des Gewebsfaktors (*tissue factor*, TF) auf Endothelzellen nach einer Gewebsverletzung (Abbildung 2). Aktivierter FVIIa lagert sich mit TF an einer Oberfläche aus Phospholipiden zu einem Komplex zusammen, der auch als Gewebsthromboplastin bezeichnet wird. Dieser Prozess ist Ca^{2+} -abhängig [Monroe DM et al. 2006].



Gemeinsamer Weg zur Thrombinbildung

Gewebsthromboplastin aktiviert FIX und FX. FIXa bildet Ca^{2+} -abhängig mit FVIIa und dem thrombozytären PF-3 den sogenannten Tenase-Komplex [Ahmad SS et al. 2003]. Dieser spaltet FX proteolytisch, sodass sich ein neuer Komplex (Prothrombinaktivator-Komplex) aus FXa und FVa Ca^{2+} -abhängig an Phospholipiden anlagern kann (Abbildung 3). Wie aus dem Namen ersichtlich, aktiviert dieser Komplex Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa), welches letztendlich die Fibrinbildung induziert [Monroe DM et al. 2006]. Dabei werden zunächst monomere Fibrinfilamente gebildet, die sich locker zu Polymeren aneinanderlagern. Erst die Aktivierung von FXIII durch Thrombin führt über eine Transglutaminasereaktion zur stabilen Quervernetzung der Fibrinprotofibrillen [Lorand L 2001]. Die Quervernetzung stabilisiert das Blutgerinnsel und im Verlauf dieses Prozesses verkürzen sich die Filamente, was als Retraktion des Thrombus bezeichnet wird [Mosesson MW 2005].

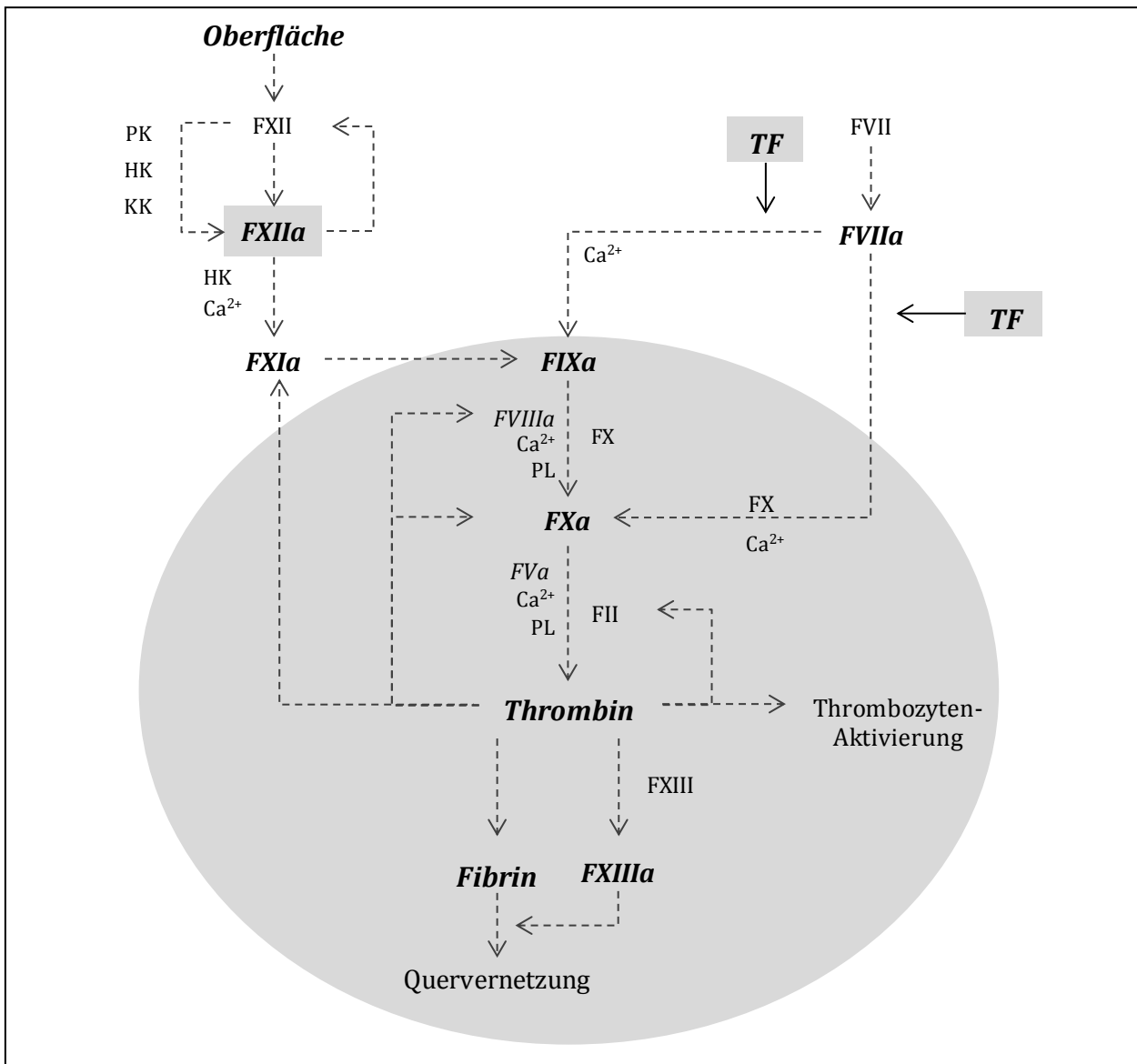


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Gerinnungsprozesse

Darstellung der Koagulationskaskade. Die intrinsische (linke Seite) und extrinsische Koagulation (rechte Seite) münden in einem gemeinsamen Weg zur Bildung von Thrombin, hier grau hinterlegt. Zentral ist die FX-Aktivierung, die im intrinsischen Weg über FXIIa, FXIa und FIXa vermittelt wird. Über den extrinsischen Weg induziert der Komplex aus TF und FVIIa Ca²⁺-abhängig und an thrombozytäre Phospholipide gebunden die Aktivierung von FX. FXa aktiviert im Folgenden Prothrombin zu Thrombin, welches durch mehrere positive Feedback-Schleifen seine eigene Bildung fördert. Weitere Funktionen von Thrombin sind die Bildung von Fibrin, die Aktivierung des Fibrin-quervernetzenden FXIIIa und außerdem die Aktivierung von Thrombozyten. HK - Hochmolekulares Kininogen; KK - Kallikrein; PK - prä-Kallikrein; PL - Phospholipide; TF - tissue factor.

Modifiziert nach Vogler EA et al. 2009.

1.2.3 Regulationsmechanismen

Der Gefäßverschluss nach einer Verletzung erfordert eine rapide und räumlich organisierte Reaktionskette zur Bildung eines Thrombus. Die Oberflächenbindung der Koagulationsfaktoren bewirkt eine Beschleunigung der Reaktionsprozesse durch Ankonzentrierung der Reaktionspartner, aber auch eine Beschränkung der Koagulation auf den verletzten Gefäßbereich. Dieser Mechanismus gewährleistet, dass in dem betroffenen Blutgefäß das Blut kontinuierlich weiter fließt, ohne dass eine thrombotische Gefäßokklusion entsteht. Die gleiche Funktion erfüllen auch Inhibitoren (z. B. C1-Inhibitor, Antithrombin), die durch eine negative Rückkopplung schon bei der Einleitung der Gerinnungskaskade aktiviert werden und eine überschießende Gerinnung verhindern sollen. Zusätzlich wirkt das fibrinolytische System von Beginn an regulierend auf die Gerinnungsprozesse.

Inhibitoren

Die plasmatischen Gerinnungsfaktoren werden durch Serinprotease-Inhibitoren (Serpine) negativ reguliert, indem das Serpin mit dem aktiven Zentrum des Faktors eine kovalente Bindung eingeht und es somit inaktiviert. Die physiologisch bedeutsamsten plasmatischen Inhibitoren in diesem System sind der C1-Inhibitor (C1-INH) und das Antithrombin (AT). Der C1-INH hemmt nicht nur den Faktor C1 des Komplementsystems, sondern außerdem die Faktoren XIIa, XIa und KK. Seine Wirkung begrenzt die Koagulation, ohne in die Thrombolyse einzugreifen. Der Hemmmechanismus agiert über eine für Serpine typische irreversible Komplexbildung mit dem Bindungspartner [Zeerleder S 2011]. Eine Defizienz von C1-INH ist assoziiert mit dem Krankheitsbild des hereditären Angioödems (HAE). Der zugrunde liegende Mechanismus ist die unkontrollierte Bildung von BK, welches in Episoden zu schmerzhaften und teils lebensbedrohlichen Schleimhautschwellungen führen kann.

AT inaktiviert Thrombin durch eine Komplexbildung, die als Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) bezeichnet wird. Weitere physiologische Zielstrukturen von AT sind die Faktoren des KPS in ihrer aktivierten Form, also FIXa und FXIa, aber auch FXa und FVIIa [Lane DA et al. 1989; Persson E et al. 2001; Rau JC et al. 2007]. Wie der C1-INH inhibiert auch AT seine unterschiedlichen Bindungspartner durch eine irreversible Komplexbildung im Verhältnis 1:1 [Olson ST et al. 1994; Rau JC et al. 2007].

In diese Reaktion greift endogenes Heparin als Katalysator ein, der den Ablauf um ein 100.000-faches beschleunigt [Gettins PG 2002]. Jedoch löst Heparin bereits bestehende Gerinnsel nicht auf, sondern verhindert eine überschießende Koagulation, die zur Okklusion des betroffenen Gefäßes führen könnte. Endogenes Heparin wird in geringen Mengen lokal aus Mastzellen sezerniert. Bei einer tiefen

Beinvenenthrombose oder zur Überbrückung der Antikoagulation von Vitamin-K-Antagonisten vor einer Operation wird aus Schweinedarmmukosa hergestelltes Heparin verwendet. Eine weitere Indikation für Heparin ist die Antikoagulation im kardiopulmonären Bypass [Ortel TL 2012; Rasoli S et al. 2012; Wells PS et al. 2014].

Ein zusätzlicher Regulationsmechanismus ist das Thrombin-induzierte Protein C-System. Dieses Vitamin-K abhängige Serpin vermittelt durch seine lange Halbwertszeit im Plasma eine systemische antikoagulative Wirkung. Aktiviertes Protein C (APC) inaktiviert FVa in Verbindung mit dem Kofaktor Protein S und daneben auch FVIIIa in Kombination mit den Kofaktoren FVa und Protein S. Beide Koagulationsfaktoren werden durch proteolytische Spaltung inaktiviert [Griffin JH et al. 2012].

Speziell die TF-induzierte Hämostase wird durch den Gewebsfaktorweg-Inhibitor (*tissue factor pathway inhibitor*, TFPI) reguliert. Das primäre Substrat für den TFPI ist FXa, der mit TFPI einen reversiblen Komplex eingeht. Der Xa-TFPI-Komplex neutralisiert den Komplex aus TF und FVIIa [Kubier A et al. 2012].

Fibrinolyse

Die Fibrinolyse stellt das Gegengewicht zur plasmatischen Gerinnung dar, denn ihre Funktion ist der Abbau des Gerinnsels. Dazu zählt die Rekanalisation eines thrombotisch okkludierten Gefäßes, was auch medikamentös eingesetzt werden kann. Eine weitere Funktion ist die Wundheilung. Die Serinprotease Plasmin ist in allen Prozessen das Schlüsselenzym, das Fibrin proteolytisch in seine Spaltprodukte degradiert. Seine Vorstufe Plasminogen zirkuliert nach seiner regulierten Freisetzung aus der Leber als Zymogen im Plasma [Castellino FJ et al. 2005]. Unter physiologischen Bedingungen wird Plasminogen bei der Thrombusentstehung im Gerinnsel als plasmatischer Bestandteil mit eingeschlossen. Die Aktivierung von Plasminogen erfolgt hauptsächlich über den Urokinase-Typ Plasminogenaktivator (u-PA) und der Gewebs-spezifische Plasminogen-Aktivator (t-PA), aber auch FXIIa kann Plasminogen zu Plasmin aktivieren [Goldsmith GH Jr. et al. 1978; Kluft C et al. 1987; Mandle RJ, Jr. et al. 1979].

Auch die Fibrinolyse unterliegt mehreren Regulationsmechanismen, von denen die drei wichtigsten das α_2 -Antiplasmin, die Plasmin-Aktivator-Inhibitoren (PAIs) und der Thrombin-aktivierte Fibrinolyse-Inhibitor (TAFI) sind. An Fibrin gebundenes Plasmin ist jedoch vor einer Inaktivierung geschützt, wodurch eine effiziente Lyse des Gerinnsels gewährleistet wird [Wiman B et al. 1978].

1.3 Das Kontaktphasensystem

Das Kontaktphasensystem (KPS) wird durch die Aktivierung von FXII an negativ geladene Fremdoberflächen aktiviert. Seine physiologische Funktion ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Als aktivierende Fremdoberflächen dienen beispielsweise anionische Poly-P auf aktivierten Plättchen oder Bestandteile der Zellmembran von in die Blutbahn eingedrungenen Pathogenen [Herwald H et al. 2012]. Daher wird angenommen, dass das KPS eine Rolle bei der Immunabwehr spielt, in dem die Pathogene durch eine KPS-induzierte Thrombose immobilisiert werden. Darüber hinaus mündet die Aktivierung von FXIIa in der Bildung des pro-inflammatorischen Mediators BK. Die Freisetzung von BK induziert eine Vasodilatation und weitere inflammatorische Prozesse, worauf im Folgenden noch genauer eingegangen wird.

Die vier Bestandteile des Kontaktphasensystems sind Faktor XII (FXII), plasmatisches prä-KK, hochmolekulares Kininogen (HK) und FXI. Über HK sind FXI oder prä-KK an zelluläre Oberflächen gebunden, während FXII als Zymogen im Blut zirkuliert. Ein Kontakt zwischen negativ geladenen Oberflächen und FXII entsteht beispielsweise bei einer Freisetzung von Poly-P auf der Membran aktivierter Thrombozyten. Durch eine transiente Bindung an diese Poly-P wird der plasmatische FXII einer Konformationsänderung unterzogen, die ihn in einen aktivierten Zustand überführt (FXIIa). FXIIa kann nun seine Substrate FXI zu FXIa und prä-KK zu KK durch proteolytische Spaltung aktivieren. KK setzt aus dem oberflächengebundenen HK letztendlich das vasoaktive Peptid BK frei. Dahingegen unterstützt FXIa eine Thrombinbildung [Colman RW et al. 1997; Konings J et al. 2011; Renné T et al. 2005].

1.3.1 Faktor XII

Die Rolle des FXII in der Gerinnung war lange Zeit unklar, da sein hereditärer Mangel in FXII-defizienten Patienten nicht zu einem erhöhten Blutungsrisiko führt. In den vergangenen 10 Jahren konnten jedoch Beobachtungen aus der Grundlagenforschung neues Interesse an den physiologischen Funktionen von FXII wecken. FXII induziert die intrinsische Koagulation über FXI und die Fibrinolyse über Plasmin [Braat EA et al. 1999; Cheng Q et al. 2010]. Die FXII-vermittelte Aktivierung von prä-KK mündet in der Propagation pro-inflammatorischer Prozesse wie der Aktivierung des Komplementsystems (C1) und der Freisetzung von BK [Reddigari SR et al. 1993]. BK bewirkt eine Vasodilatation und fördert durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität eine Ödembildung (Abbildung 4) [Bryant JW et al. 2009]. Aufgrund dieser vielfältigen Beteiligung an maßgeblichen physiologischen Prozessen in Kombination mit einem kaum offensichtlichen Phänotyp beim Fehlen des Faktors ist die Rolle von FXII in

vivo immer noch Gegenstand wissenschaftlicher Debatten. Im Gegensatz zu einem FVIII-Mangel mit einem hämophilen Phänotyp werden Patienten mit einer FXII-Defizienz eher zufällig in Routine-Untersuchungen entdeckt. Denn durch die FXII-Defizienz ist die aPTT der Patienten verlängert, obwohl sie keine antikoagulative Therapie erhalten haben [Bugge TH et al. 1996; Rosen ED et al. 1997].

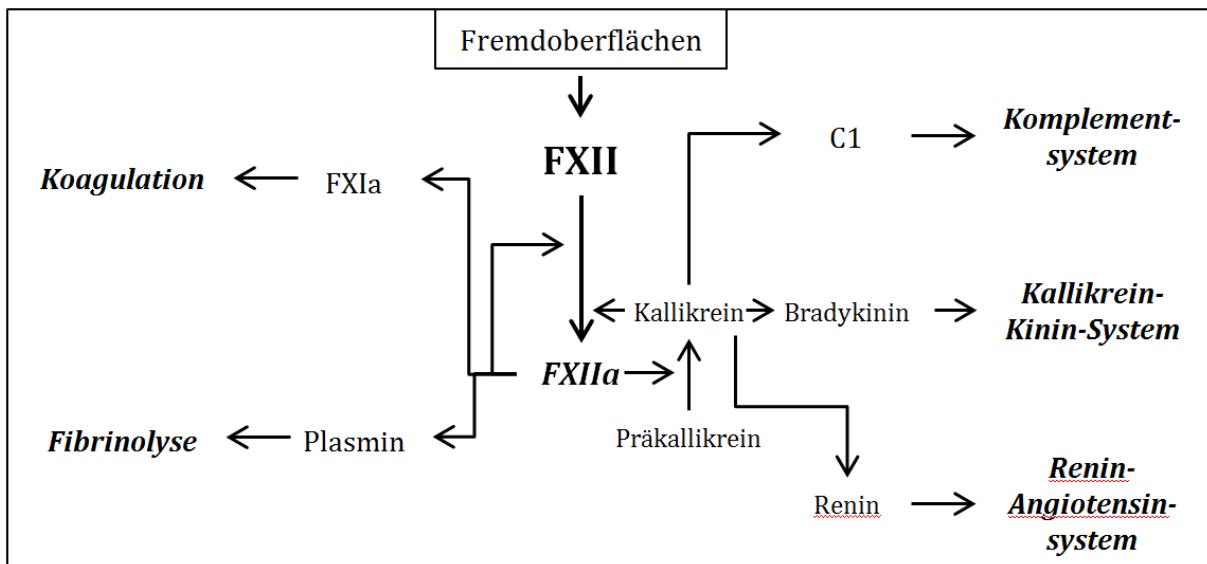


Abbildung 4: Funktionen von FXII

Der Koagulationsfaktor FXII im Kontext mit den durch ihn beeinflussten physiologischen Systemen. Die Aktivierung von FXII erfolgt autokatalytisch, durch proteolytische Enzyme oder anionische (Fremd-) Oberflächen. Die Koagulation wird über die FXIIa-vermittelte FXI-Aktivierung initiiert (oben links). Gleichzeitig wirkt FXIIa als Regulator der Koagulation, in dem FXIIa das fibrinolytisch wirkende Plasmin induziert (unten links). Auf der rechten Seite der Grafik sind die Kallikrein-vermittelten Prozesse dargestellt, die immunologische Prozesse beeinflussen. Über den Komplementfaktor C1 wird das Komplementsystem über den klassische Weg induziert, der zum nativen Immunsystem gehört. Im Rahmen der Komplementaktivierung entstehen die anaphylaktischen Mediatoren C3a und C5a, sowie der Membranangriffskomplex zur Lyse von markierten Zellen. Rechts mittig wird der Einfluss auf das pro-inflammatorische Kallikrein-Kinin-System gezeigt. Aktiviertes Kallikrein bewirkt die Freisetzung des Gewebshormons Bradykinin aus Hochmolekularem Kininogen, was in Vasodilatation, erhöhter Gefäß-permeabilität, verändertem Schmerzempfinden und Ödembildung resultiert. Zudem bewirkt Kallikrein die Aktivierung des Renin-Angiotensin-System (unten rechts), wobei Kallikrein Renin-vermittelt die Vasokonstriktion induziert. Darstellung modifiziert nach Fuhrer G et al. 1990.

Proteinstruktur des Faktor XII

Die genetische Information für den Koagulationsfaktor XII liegt als einzelnes Gen auf Chromosom 5 (5q33-qter) vor [Citarella F et al. 1988; Cool DE et al. 1987]. Der Faktor wird wie die meisten Gerinnungsfaktoren in Hepatozyten synthetisiert und als Zymogen ins Plasma sezerniert. Unter physiologischen Bedingungen zirkuliert FXII mit einer Konzentration von etwa 29 µg/mL im Plasma [Revak SD et al. 1974]. Das einkettige Glykoprotein besteht aus einer schweren Kette (353 Aminosäuren) und einer leichten Kette (243 Aminosäuren), welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Das Zymogen von FXII besitzt ein Molekulargewicht von rund 80 kDa [Cool DE et al. 1987] und setzt sich aus 8 Strukturdomänen zusammen (Abbildung 5). Direkt am N-Terminus befindet sich eine Fibronectin-Domäne vom Typ II, darauf folgt die erste EGF-ähnliche Domäne, die durch eine weitere Fibronectin-Domäne (Typ I) von der zweiten EGF-ähnliche Domäne getrennt wird. Daran reiht sich eine Kringle-Domäne, gefolgt von einer Prolin-reichen Region. C-terminal befindet sich die katalytische Domäne der Protease. Besonders die Fibronectin-Domänen sind von Bedeutung für die Autoaktivierung des Faktors an körperfremden bzw. negativ geladenen Oberflächen [Cool DE et al. 1987]. Hierbei entsteht die aktivierte Form FXIIa. Die weitere proteolytische Spaltung des Faktors FXIIa bewirkt die Freisetzung eines 28 kDa-Fragments (β -FXIIa) in das Plasma [Fujikawa K et al. 1988], wobei ein 52 kDa großes Fragment an der prokoagulanten Oberfläche gebunden bleibt (α -FXIIa) [Mahdi F et al. 2002; McMullen BA et al. 1985; Revak SD et al. 1978].

Die Form α -FXIIa kann weiterhin aktivierend auf FXII wirken, wohingegen die aktivierenden Funktionen des β -FXIIa-Fragments auf prä-KK und C1r beschränkt sind [Ghebrehiwet B et al. 1983; Radcliffe R et al. 1977; Revak SD et al. 1978]. Der N-Terminus von α -FXIIa besitzt eine große Ähnlichkeit mit t-PA [Konings J et al. 2011].

Unter (patho-) physiologischen Bedingungen dienen mit großer Wahrscheinlichkeit Endothelzellen, Thrombozyten und Leukozyten als Oberfläche zur Autoaktivierung des FXII-Zymogens [Renné T et al. 2012; von Brühl ML et al. 2012]. Die Bindung von FXII an Endothelzellen erfolgt Zink-abhängig an den Urokinase-Rezeptor (u-PAR) Cytokeratin-1 (CK-1) und den Rezeptor des Komplementfaktors C1q gC1qR [Colman RW et al. 1997; Joseph K et al. 1996; Joseph K et al. 1999]. Dabei fungiert u-PAR als Anker in der Zellmembran, während CK-1 als lokales Bindeglied zwischen u-PAR und gC1qR wirkt [Kaplan AP et al. 2010]. Diese Kombination vermittelt zum Einen die Anheftung von HK an Endothelzellen, und zum Anderen die örtliche Ankonzentrierung von FXII. Des Weiteren übt FXIIa über u-PAR eine mitogene Wirkung aus.

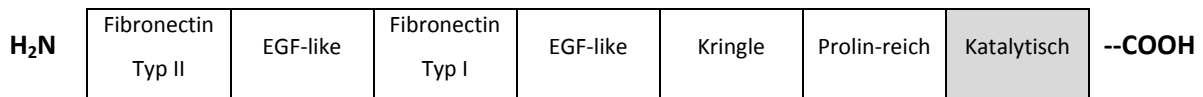


Abbildung 5: Strukturdomänen von FXII

Die Strukturdomänen von FXII. Der Fokus liegt auf dem schematischen Aufbau und der Abfolge der Protease-Domänen, ohne die Länge der Aminosäureketten zu berücksichtigen. Begonnen vom N-Terminus sind schematisch die acht funktionellen Domänen von FXII abgebildet. An die Fibronectin-Domäne vom Typ II (AS 1-88) schließt sich eine EGF-ähnliche Domäne (AS 94-131) und eine weitere Fibronectin-Domäne (Typ I; AS 133-173) an. Darauf folgt eine zweite EGF-ähnliche Domäne (AS 174-210), eine Kringle-Domäne (AS 215-295) und eine Prolin-reiche Region (AS 296-349). C-terminal befindet sich schließlich die katalytische Domäne der Protease (AS 354-596). AS: Aminosäure.

Modifiziert nach Cool DE et al. 1987 und Stavrou E et al. 2010.

Aktivierung des Faktor XII

In vitro kann FXII als Zymogen durch verschiedene Materialien in seinen aktiven Zustand überführt werden. Bei Gerinnungstests werden dafür häufig Glas, Kaolin und Dextransulfat verwendet. Die Aktivierung durch Kaolin wird insbesondere bei der aktivierten partiellen Prothrombinzeit (aPTT) ausgenutzt (Kap. 3.4). Die physiologischen Aktivatoren des FXII sind noch nicht vollständig bekannt, sind zurzeit aber Gegenstand der Forschung. *In vivo* konnte nachgewiesen werden, dass Kollagen der subendothelialen Matrix [van der Meijden PE et al. 2009], Poly-P auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten [Müller F et al. 2009], fehlgefaltete Proteine [Maas C et al. 2008], extrazelluläre RNA und DNA [Kannemeier C et al. 2007] bzw. NETs [Fuchs TA et al. 2010; von Brühl ML et al. 2012] in der Lage sind, das Zymogen FXII zu aktivieren. Darüber hinaus können bei einer Infektion Bestandteile der bakteriellen Zellwand FXII aktivieren [Herwald H et al. 1998].

Diese Vielfalt an Substanzklassen spiegelt die vielfältige Funktion von FXII wider, wobei die Art der Aktivierung maßgeblich den Ablauf einer prokoagulatorischen oder inflammatorischen Reaktion nach FXIIa-Aktivierung bestimmt. Über die Aktivierung des Substrats FXI fördert FXIIa eine verstärkte Thrombinbildung, die das Wachstum eines Gerinnsels unterstützt. Diese prokoagulante Funktion wird *in vivo* vor allem durch die FXII-Aktivatoren Kollagen und thrombozytäre Poly-P induziert [Woodruff RS et al. 2011]. Die Aktivierung durch Nukleinsäuren (RNA, DNA und NETs) und amorphe Proteinaggregate resultiert in den pro-inflammatorischen Funktionen von FXIIa. Die genannten Strukturen bieten negativ geladene Oberflächen, an denen die Autoaktivierung von FXII zu FXIIa stattfinden

kann. In Anwesenheit von an HK-gebundenes prä-KK induziert FXIIa daraufhin die Bildung von KK. Im nächsten Schritt kann plasmatisches KK die Freisetzung des Gewebehormons BK mit vasoaktiven Eigenschaften einleiten. Gleichzeitig wirkt plasmatisches KK in einer positiven Verstärkerschleife aktivierend auf FXII (Abbildung 6). Ob eine prokoagulante oder eine pro-inflammatorische Funktion von FXII induziert wird, ist wahrscheinlich abhängig von der Orientierung des FXII-Zymogens bei seiner Autoaktivierung und der biochemische Zusammensetzung der umgebenden flüssigen Phase [Golas A et al. 2011]. Unter pathophysiologischen Bedingungen ist vermutlich die Aktivierung von FXII an Fremdoberflächen der klassische Induktor des KPS [Gailani D et al. 2007].

Funktionen des Faktor XII

Die Kontaktphasenaktivierung verläuft über das Zusammentreffen der Kontaktfaktoren mit negativ geladenen Oberflächen. FXII besitzt mehrere Domänen, die eine Bindung an diese Oberflächen ermöglichen. Im Detail sind das die beiden Fibronectin-Domänen (Typ I und Typ II) und die Kringle-Domäne [Citarella F et al. 1996; Citarella F et al. 2000; McMullen BA et al. 1985].

Nach Immobilisierung erfolgt im FXII-Zymogen eine Konformationsänderung, die durch die Exposition der katalytischen Domäne auch als Autoaktivierung bezeichnet wird [Miller G et al. 1980; Samuel M et al. 1992]. Die Autoaktivierung verläuft relativ langsam. Physiologisch günstiger ist die KK-vermittelte Aktivierung von FXII, da sie 29-fach schneller verläuft, als die Autoaktivierung [Dunn JT et al. 1982; Griffin JH 1978; Tankersley DL et al. 1984; Wiggins RC et al. 1979]. Die FXIIa-Aktivierung über KK gewährleistet eine ausreichende Konzentration von FXIIa zur Induzierung von FXIa bzw. Freisetzung von BK (Abbildung 6). Im Detail bindet plasmatischer FXII zunächst an eine negativ geladene Oberfläche. Unter physiologischen Bedingungen sind das beispielsweise Poly-P auf der Oberfläche von Thrombozyten, extrazelluläre RNA, NETs, Kollagen oder amorphe Proteinaggregate. Pathophysiologische Aktivatoren von FXIIa *in vivo* können Bestandteile der bakteriellen Zellwand oder auch intravaskuläre Prothesen wie Stents sein.

Schon die Anheftung führt FXII in einen aktivierten Zustand über (FXIIa), was ihn für eine proteolytische Spaltung durch plasmatisches KK leichter zugänglich macht [Griffin JH 1978; Revak SD et al. 1976]. Neben KK kann Plasmin die Bildung von α -FXIIa induzieren [Hovinga JK et al. 1994; McMullen BA et al. 1985]. Durch eine Spaltung der Disulfid-Brückenbindungen kann KK aus α -FXIIa die lösliche Form β -FXIIa freisetzen [Fujikawa K et al. 1983; Revak SD et al. 1977; Revak SD et al. 1978]. Die α -FXIIa-Form bleibt Oberflächen-gebunden, wo sie die Aktivierung von FXI und prä-KK durch proteolytische Spaltung induzieren kann [Bouma BN et al. 1977; Girey GJ et al. 1972; Kaplan AP et al. 1971;

Kaplan AP 1983]. Als Bestandteil des intrinsischen Gerinnungswegs mündet die FXI-Aktivierung in der Bildung von Thrombin. KK hingegen spaltet proteolytisch seinen Bindungspartner HK, wodurch die proinflammatorischen Eigenschaften des KPS mit der Freisetzung von BK eingeleitet werden. Die Oberflächen-gebundenen Aktivierungsprozesse zwischen FXII und prä-KK beschleunigen die Reaktionen um ein Vielfaches in beide Richtungen der Feedbackschleife, da die beteiligten Faktoren in konzentrierter Form vorliegen [Tankersley DL et al. 1984].

Im Gegensatz zu α -FXIIa ist das Spaltprodukt β -FXIIa nicht an Oberflächen gebunden und wird ins Blut freigesetzt. Als β -FXIIa verliert die Protease ihre katalytische Funktion zur Aktivierung von FXI, kann jedoch weiterhin C1r induzieren [Ghebrehiwet B et al. 1983; Kaplan AP et al. 1981; Radcliffe R et al. 1977]. Die Loslösung des Faktors trägt vermutlich zur Verbreitung der KK-abhängigen Prozesse bei. Weiterhin wird eine inflammatorische Reaktion durch β -FXIIa aufrechterhalten, die C1r-vermittelt zur Bildung der Anaphylatoxine C3a und C5a führt [Amara U et al. 2010].

Unter physiologischen Umständen spielt die Aktivierung von FXII bei einer TF-induzierten Koagulation keine tragende Rolle [Gailani D et al. 1991]. Wird bei einer Verletzung ausreichend TF an der geschädigten Stelle freigesetzt, kann durch die extrinsische Koagulation eine suffiziente Menge an Thrombin gebildet werden. Für die Aufrechterhaltung der Thrombinbildung während der Koagulation wirkt Thrombin über eine positive Rückkopplung aktivierend auf FXI. Diese Reaktion verläuft FXII-unabhängig und spielt vermutlich besonders bei niedrigen TF-Konzentrationen in der Hämostase eine Rolle [Kravtsov DV et al. 2009; von dem Borne PA et al. 1995]. Im Gegensatz dazu trägt die FXIIa-vermittelte Koagulation zum Wachstum und zur Stabilität eines Gerinnsels unter pathologischen Bedingungen (Thrombose) bei [Renné T et al. 2005; Renné T et al. 2012]. Dabei erhöht die Anwesenheit von FXIIa die Dichte des Gerinnsels und damit seine Stabilität [Konings J et al. 2012].

In der Regel entsteht eine Thrombose nicht durch eine Gefäßverletzung, sondern beispielsweise im Rahmen von Arteriosklerose. Bei einer Plaque-Ruptur werden TF, vWF und Kollagen der subendothelialen Matrix freigesetzt, wodurch Thrombozyten aus dem Blutstrom rekrutiert werden [De Meyer GR et al. 1999; Penz S et al. 2005; Rother E et al. 2003]. Die Aktivierung und Aggregation der Plättchen wird durch die Poly-P-vermittelte FXII-Aktivierung unterstützt, in dem zusätzliches Thrombin zur Propagation des Thrombuswachstums zur Verfügung gestellt wird [Maas C et al. 2011; Woodruff RS et al. 2011]. Dementsprechend wirkt FXII unter diesen Bedingungen als Verstärker der thrombotischen Koagulation unter pathophysiologischen Bedingungen [Cheng Q et al. 2010; Renné T et al. 2005; Renné T et al. 2012].

Plasmatischer FXII wird durch den Kontakt mit anionischen Oberflächen in die aktivierte Form (FXIIa) überführt. Der Prozess läuft autokatalytisch ab, wobei FXIIa an der Oberfläche gebunden bleibt. Ebenso binden die Komplexe aus HK-prä-KK und HK-FXI an Oberflächen mit negativer Ladung, wo sie durch α -FXIIa aktiviert werden. KK induziert eine weitere proteolytische Spaltung von FXIIa, wodurch α -FXIIa entsteht. Dieses aktiviert sowohl FXI als auch prä-KK. Die Proteolyse von FXI mündet in einer Koagulation, vermittelt über den intrinsischen Gerinnungsweg. Die Spaltung von Präkallikrein durch α -FXIIa erzeugt plasmatisches KK. Dieses ist in der Lage sich von seinem Partner HK zu lösen. Zudem spaltet KK aus HK den Entzündungsmediator BK ab, wodurch das KPS pro-inflammatorische Prozesse einleitet. Des Weiteren initiiert KK die Bildung von löslichem β -FXIIa. Die gestrichelten Pfeile kennzeichnen proteolytische Aktivierungsprozesse an. Zymogene und ihre aktiven Spaltprodukte sind mit schmalen durchgängigen Pfeilen verbunden. Durch dicke durchgezogene Pfeile wird vereinfacht die Folge der initiierten Prozesse verdeutlicht. BK = Bradykinin; HK = Hochmolekulares Kininogen; KK = Kallikrein; prä-KK = Präkallikrein. Schema erstellt aus Informationen von Fuhrer G et al. 1990, Stavrou E et al. 2010 und Woodruff RS et al. 2011.

Regulation des Faktor XII

Der C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) gilt als der wichtigste Inhibitor von FXII. Dieses Serpin inhibiert nicht nur α -FXIIa, sondern auch β -FXIIa, sodass der C1-INH zu mehr als 90 % die Wirksamkeit des FXIIa innerhalb weniger Minuten terminiert [de Agostini A et al. 1984; Pixley RA et al. 1985b; Revak SD et al. 1978; Willemin WA et al. 1996]. Pixley et al. fanden außerdem geringere inhibitorische Aktivitäten von α 2-Antiplasmin und α 2-Macroglobulin auf FXII [Pixley RA et al. 1985a]. Unter physiologischen Bedingungen wird vermutlich die durch Fremdoberflächen aktivierte Form von FXII hauptsächlich durch den C1-INH reguliert. Back et al. konnten jedoch beobachten, dass der durch thrombozytäre Poly-P aktivierte FXII außerdem durch AT inhibiert wird [Back J et al. 2009; Woodruff RS et al. 2011]. Als Komponente der intrinsischen Koagulation wird FXIa ebenfalls durch den C1-INH gehemmt. Ein zusätzlicher Inhibitor von FXIa ist das Akute-Phase-Protein α 1-Antitrypsin [Willemin WA et al. 1995; Willemin WA et al. 1996].

Faktor XII-Defizienz

Der erste Fall von FXII-Defizienz wurde zufällig bei einer präoperativen Routineuntersuchung bei dem damals 37-jährigen Patienten John Hageman entdeckt. Klinisch war der Patient unauffällig und es wurde keine erhöhte Blutungstendenz festgestellt. Das einzige Indiz war die verlängerte aPTT, obwohl keine Antikoagulation vorlag und der Patient offenbar nicht unter einer Hämophilie litt. Untersuchungen von Ratnoff et al. konnten nachweisen, dass im Blut von J. Hageman ein Faktor fehlte, der für die Glas-induzierte Koagulation verantwortlich ist. 1958 veröffentlichten sie ihre Beobachtungen über den „Hagemann-Faktor“, oder auch Gerinnungsfaktor XII [Ratnoff OD et al. 1958].

Obwohl John Hageman keine Blutungsneigung zeigte, verstarb er in früh an einer pulmonalen Embolie [Ratnoff OD 1968]. Daraufhin wurde eine FXII-Defizienz mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer Thromboembolie assoziiert. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass J. Hageman zu diesem Zeitpunkt nach einem Beckenbruch bettlägerig war. Zudem gehörte die prophylaktische Antithrombose für immobilisierte Patienten zu der Zeit in Krankenhäusern nicht zur Standard-Medikation.

Ob eine FXII-Defizienz im Menschen ein Risiko für Thromboembolismus darstellt, wird nach wie vor diskutiert. Halbmayer et al. vermuteten 1992 eine FXII-Defizienz als Risikofaktor für rekurrende venöse und arterielle Thromboembolien [Halbmayer WM et al. 1992]. Bei Studien zum Thromboembolie-Risiko in heterozygot FXII-defizienten Patienten konnte nicht bestätigt werden, dass ein

reduzierter FXII-Plasmaspiegel verstärkt Thromboembolien fördert [von Kanel R et al. 1992]. Die Analyse der durchschnittlichen FXII-Defizienz in der Bevölkerung zeigte, dass eine Prävalenz von 1,5-3 % vorliegt, ohne thromboembolische Symptome durch den FXII-Mangel zu verursachen [Halbmayer WM et al. 1994]. Darüber hinaus wurde eine weitere Studie von Zeerleder et al. durchgeführt, die für sechs Jahre eine Gruppe aus 73 Personen mit unterschiedlichem FXII-Level überwachte. Zeerleder et al. konnten keine erhöhte Thrombophilie verursacht durch eine FXII-Defizienz beobachten [Zeerleder S et al. 1999].

Im Gegensatz dazu stellten Tirado et al. bei der Untersuchung eines homozygoten Polymorphismus auf dem F12-Gen (46C→T) fest, dass die reduzierte Funktion von FXII das Risiko für das Auftreten einer venösen Thromboembolie erhöht. Die Analyse genereller Risikofaktoren für eine Thrombose zeigte dabei, dass die Thromboembolie davon unabhängig auftrat [Tirado I et al. 2004].

Da die vorgestellten Daten sehr kontrovers sind, lag die Entwicklung eines neuen Testsystems zur Erforschung der FXII-Funktion *in vivo* nahe. 2004 wurde von Pauer et al. eine FXII-Knockout (K. O.) Maus-Linie vorgestellt. Die homozygoten FXII-K.O.-Tiere unterschieden sich phänotypisch nicht von den Wildtypen, mit Ausnahme einer aPTT-Verlängerung [Pauer HU et al. 2004]. Wie bei FXII-defizienten Menschen konnte auch in den FXII-K.O.-Mäusen keine Blutungsneigung beobachtet werden. Weitere Studien in den FXII-K.O.-Mäusen werden in der Diskussion weiter erläutert und in Bezug zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit gesetzt.

1.3.2 Weitere Faktoren des Kontaktphasensystems

Hochmolekulares Kininogen

Das einkettige Glykoprotein des hochmolekularen Kallikreins (HK) besitzt eine molekulare Masse von ca. 115 kDa. Die normale plasmatische Konzentration liegt bei 70-90 µg/mL [Kerbiriou DM et al. 1979; Mandle RJ et al. 1976]. Als Bestandteil des KPS ist HK ein obligater Kofaktor, der eine nicht-kovalente Komplexbildung mit prä-KK oder FXI auf Endotheloberflächen oder anderen Oberflächen mit negativer Ladung eingeht [Mandle RJ et al. 1976; Silverberg, M et al. 1980; Thompson RE et al. 1977].

Das Nonapeptid BK wird proteolytisch aus dem Kofaktor HK gespalten (siehe Abschnitt Bradykinin). Durch FXIIa aktiviertes Plasmakallikrein oder Gewebekallikrein kann die Abspaltung von BK aus HK induzieren [Nakayasu T et al. 1979; Reddigari SR et al. 1989].

Präkallikrein

Wie andere Serinproteasen zirkuliert auch Präkallikrein (prä-KK) als Zymogen im Plasma, zu etwa 90 % als Komplex mit HK über eine nicht-kovalente Bindung [Bock PE et al. 1985; Mandle R, Jr. et al. 1977; Mandle RJ et al. 1976]. Diese Bindung vermittelt die Adhäsion von prä-KK an negativ geladene Oberflächen. Prä-KK wird durch FXIIa oder β -FXIIa aktiviert [Ghebrehiwet B et al. 1983] und in Folge kann das gebildete plasmatische KK aus seinem Trägermolekül HK Bradykinin abspalten [Bock PE et al. 1985; Mandle RJ et al. 1976; Tait JF et al. 1987; Thompson RE et al. 1979]. Im Gegensatz zu FXIIa ist KK nicht obligat an Oberflächen gebunden. Da die KK-Moleküle frei im Plasma zirkulieren können, wird vermutet, dass sie die FXII-Aktivierung weiter verbreiten [Cochrane CG et al. 1980; Silverberg M et al. 1980]. Eine weitere Funktionen für KK ist die Chemotaxis für neutrophile Granulozyten und Monozyten [Gallin JI et al. 1974; Kaplan AP et al. 1972]. Im Komplementsystem aktiviert KK den Faktor B und im Renin-Angiotensin-System fördert KK die proteolytische Spaltung von Prorenin zu Renin [Derkx FH et al. 1979; Discipio RG 1982; Sealey JE et al. 1979].

Bradykinin

Der vasoaktive, inflammatorische Mediator Bradykinin (BK) besteht aus neun Aminosäuren, die an zwei Positionen KK-vermittelt aus dem Kofaktor HK abgespalten werden. Das aktive Nonapeptid bindet an die beiden Rezeptortypen B1-R und B2-R, die auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen der *Tunica media* exprimiert werden [Figuerola CD et al. 2001]. Die Expression des Rezeptors B1-R wird bei inflammatorischen Prozessen über IL-1 und TNF- α unter anderem auf Endothelzellen induziert und vermittelt wiederum die Freisetzung der pro-inflammatorischen Mediatoren IL-1 und TNF- α aus neutrophilen Granulozyten [Davis AJ et al. 1994; Fernandes ES et al. 2005; Leeb-Lundberg LM et al. 2005; Marceau F 1995]. Der zweite Rezeptor B2-R wird konstitutiv auf den meisten Zelloberflächen exprimiert. Seine Aktivierung resultiert in einer Vasodilatation des Gefäßendothels sowie einer erhöhten vaskulären Permeabilität. Dieser Prozess wird verstärkt durch die Freisetzung weiterer vasodilatatorischer Mediatoren (NO, PGE2, PGI2) [Regoli D et al. 1980].

Physiologisch wirkt BK vasodilatatorisch, wodurch lokal der Blutdruck gesenkt wird [Leeb-Lundberg LM et al. 2005]. Neben der Einleitung inflammatorischer Prozesse spielt BK eine Rolle in der Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen und der Entstehung einer experimentellen Diabetes im Nager-Modell [Couture R et al. 2001; Leeb-Lundberg LM et al. 2005].

Die plasmatische Halbwertszeit von BK liegt unter 30 Sekunden und wird durch drei Inhibitoren limitiert [Kariya K et al. 1982]. Das Angiotensin konvertierende Enzym (ACE) degradiert BK in mehreren Schritten innerhalb weniger Sekunden vollständig und ist der wichtigste Inhibitor der BK-Wirkung [Erdos EG 1990; Jaspard E et al. 1993]. Während ACE hauptsächlich auf der Oberfläche des pulmonalen Endothels lokalisiert ist, gibt es zwei weitere Carboxypeptidasen zum Abbau von BK: Die Carboxypeptidasen M und N. Die Carboxypeptidase M wird ebenfalls pulmonal exprimiert und ist wie ACE an Oberflächenmembranen gebunden [Zhang X et al. 2008]. Die plasmatische Carboxypeptidase N dagegen spaltet C-terminal einen Arginin-Rest von BK ab. Das resultierende Octapeptid wird als Des-Arg-Bradykinin bezeichnet und kann weiterhin den B1-R aktivieren [Erdos EG et al. 1962; Kerbiriou DM et al. 1979; Kurachi K et al. 1977; Marceau F 1995]. Die Carboxypeptidase N degradiert außerdem auch die Anaphylatoxine C3a und C5a des Komplementsystems [Perez HD et al. 1988; Zhang X et al. 2008].

Faktor XI

Koagulationsfaktor XI ist ein Bestandteil des KPS und gleichzeitig des intrinsischen Gerinnungssystems. Er besteht aus zwei identischen Untereinheiten zu je zwei Ketten, die über Disulfid-Brückenbindungen miteinander verbunden sind [Bouma BN et al. 1977; Kurachi K et al. 1977]. Das Dimer hat eine molekulare Masse von etwa 160 kDa und besitzt pro Molekül eine katalytische Domäne auf der leichten Kette. Wie bei den meisten Serinproteasen besteht die katalytische Trias aus His423, Asp462 und Ser557 [Minnema MC et al. 1999]

Mit einer Konzentration von 4-6 µg/mL zirkuliert FXI ebenfalls als Zymogen im Plasma, wobei jeweils 1 bis 2 Moleküle nicht-kovalent an je ein Molekül HK gebunden sind [Thompson RE et al. 1977]. Wie KK benötigt FXI ebenfalls HK als obligaten Kofaktor, der die Bindung an negativ geladene Oberflächen vermittelt und seine Aktivierungskapazität fördert [Griffin JH et al. 1976; Wiggins RC et al. 1977]. FXIIa aktiviert FXI, wenn er sich im Komplex mit HK befindet. Alternativ kann FXI auch durch Thrombin aktiviert werden, falls FXI Bestandteil eines Fibringerinnsels ist [Gailani D et al. 1991; Naito K et al. 1991].

1.4 Thrombotische Hämostasestörungen

Die Ursachen und Krankheitsbilder für thrombotische Hämostasestörungen sind sehr unterschiedlich. Im Folgenden wird der Fokus auf die häufigsten kardiovaskulären Erkrankungen gelegt, die nachweislich in Zusammenhang mit einer FXII-Aktivierung stehen.

1.4.1 Thrombosen und Folgeerkrankungen

Arterielle Thromboseerkrankungen

Die Plätze eins und zwei der lebensbedrohlichen Erkrankungen werden durch die arteriellen Thrombose-Erkrankungen Myokardinfarkt und Schlaganfall belegt. Im Jahr 2008 starben 244,8 von 100.000 Menschen an den Folgen einer kardiovaskulären Erkrankung und jedes Jahr erleiden etwa 795.000 Menschen einen ersten oder rekurrenden Schlaganfall [Roger VL et al. 2012]. Die einzelnen pathologischen Entitäten werden in Abbildung 7 (S. 34) dargestellt.

Arteriosklerotische Veränderungen der Gefäßinnenwand sind die Hauptursache für die Entstehung einer arteriellen Thrombose. Eine Dysfunktion des Endothels begünstigt eine chronische Entzündung, in deren Verlauf Lipide, Immunzellen und fibröse Elemente in die Intima eingelagert werden [Goldstein JL et al. 1977; Ross R 1999]. Gesammelt wird die Ablagerung als Plaque bezeichnet. Sie entwickelt sich bevorzugt in Gefäßen, bei denen die laminare Strömung des Blutes durch eine Bifurkation oder durch Kurvaturen gestört ist, wie beispielsweise in der *A. carotis communis* und in den Koronararterien. Dort begünstigen eine reduzierte Blutflussgeschwindigkeit und verringerte Scherkräfte mechanisch die Ablagerung von im Blut zirkulierenden Partikeln, wie beispielsweise LDL [Glagov S et al. 1988]. Das LDL bildet Aggregate, wird durch die Bindung an Proteoglykane der Intima immobilisiert und ist so zugänglich für biochemische Modifizierungen wie die Oxidierung [Camejo G et al. 1998; Skalen K et al. 2002]. Die Akkumulation der LDL-Partikel fördert lokal die endotheliale Dysfunktion, wodurch Leukozyten rekrutiert werden [Kuiper J et al. 2007; Patel S et al. 2006].

Anschließend wandern Makrophagen ein und phagozytieren das oxidierte LDL, wodurch sie eine Umwandlung zu pro-inflammatorischen Schaumzellen durchlaufen [Gimbrone MA, Jr. et al. 1995]. Außerdem infiltrieren T-Zellen die Intima, die anschließend zu TH₁-Zellen differenzieren und Zytokinvermittelt inflammatorische Prozesse forcieren [Zhou X et al. 2005]. Diese resultieren in einer Proliferation der glatten Muskelzellen und breiten sich auch in die tieferen Schichten der Gefäßwand aus

[Glagov S et al. 1987; Stary HC et al. 1995]. Die Lipid-haltige Ablagerung mit den Immunzellen in der Intima wird von einer fibrösen Bindegewebskappe geschützt.

Die extrazellulären Bestandteile der fibrösen Kappe werden von Zellen der glatten Muskulatur sezerniert und bestehen aus Kollagen (Typ I und III), Proteoglykanen und Elastin-Fasern [Wight TN 1995]. Zusätzlich wird die Mineralisierung der Plaque durch die Sekretion von „*Bone morphogenetic Protein*“ aus glatten Muskelzellen gefördert [Demer LL 1995]. Dadurch wird Kalzium im geschädigten Bereich akkumuliert. Einwandernde Makrophagen exprimieren außerdem Matrixmetalloproteinasen (MMPs), die die Makromoleküle der fibrösen Kappe dynamisch remodellieren. Bei einer Überexpression der MMPs wird die Struktur der Kappe fragil [Dollery CM et al. 1995]. Zusätzlich bewirkt die Kalzium-einlagerung eine Versteifung der Arterienwand.

Durch hohe Scherkräfte im arteriellen Hochdrucksystem besteht die Gefahr einer Plaque-Ruptur, wodurch der nekrotische Kern und die subendotheliale Matrix dem Blutstrom exponiert werden. Faktoren wie TF, vWF und Kollagen initiieren die Koagulation und rekrutieren Plättchen aus dem Blutstrom [De Meyer GR et al. 1999; Penz S et al. 2005; Rother E et al. 2003; Vorchheimer DA et al. 2006]. Des Weiteren adhären Monozyten daran und induzieren eine Thrombose durch TF-Sekretion [Virmani R et al. 2006]. Diese Faktoren fördern sukzessive über eine Thrombinbildung die weitere Progression der Arteriosklerose [Kleinegris MC et al. 2012].

Obwohl die Aktivierung der Gerinnung über TF obligat für die Einleitung der Koagulation sind, wurden Hinweise dafür gefunden, dass außerdem FXII im Rahmen der arteriosklerotischen Prozesse unter anderem durch die freiliegende subendotheliale Matrix, Kollagen und thrombozytäre Poly-P aktiviert wird [Müller F et al. 2010]. Renné et al. konnten auch beobachten, dass die FXIIa-vermittelte Thrombinbildung das dreidimensionale Thrombuswachstum in Mäusen unterstützt [Renné T et al. 2005]. Die Rolle von FXIIa bei einem rupturierten Plaque wurde auch durch Kuijpers et al. in einem murinen Modell der Arteriosklerose untersucht [Kuijpers MJ et al. 2014]. Die Resultate weisen darauf hin, dass FXIIa eine Thrombin- und Fibrinbildung zur Stabilisierung des Thrombus einleitet. Dieses geschieht unabhängig und lokal distanziert von der TF-vermittelten Thrombusentstehung am Ort der Plaque-Ruptur. Diese substitutive Thrombinbildung durch FXIIa ist außerdem von Bedeutung, da die TF-vermittelte Thrombinbildung streng durch TFPI reguliert wird [Kubier A et al. 2012]. Daher wird angenommen, dass die Thrombinbildung über den intrinsischen Gerinnungsweg eine wichtige Rolle in der Entstehung von Gefäß-okkludierenden Thrombosen spielt [Renné T et al. 2005].

Klinische Beispiele für arterielle Thrombosen sind Gefäßokklusionen, die lokal in den Koronararterien einen Myokardinfarkt verursachen können was die häufigste Ursache für einen Herzstillstand oder den Sekudentod darstellt [Badimon JJ et al. 1999; Falk E et al. 1995]. Außerdem besteht im Falle einer arteriosklerotischen Plaquebildung in der *A. carotis* das Risiko einer Thrombo-Embolisierung durch eine Druckzunahme auf den hindurchfließenden Blutstrom [Cunningham KS et al. 2005]. Diese Druckveränderungen können zusätzlich mit dem Vorliegen einer Herzrhythmusstörung (Vorhofflimmern) die Ablösung von thrombotischem Material begünstigen [Hughes M et al. 2008]. Dieser Prozess kann letztendlich zu einem ischämischen Schlaganfall führen [Amarenco P et al. 2011] (siehe Kap. 1.5).

Zur Therapie der thrombotischen Gefäßokklusion kann die Blutzirkulation durch eine Thrombolyse oder durch eine Ausschabung der Arterie wiederhergestellt werden. Gleichzeitig wird durch eine gerinnungshemmende Behandlung eine erneute Thrombose unterbunden, die wiederum durch die Beeinflussung der physiologischen Hämostase eine erhöhte Blutungsneigung hervorruft.

Daher ist der Bedarf an neuartigen Konzepten zur antithrombotischen Therapie groß, die durch ein optimiertes Verhältnis zwischen Thrombosehemmung und unbeeinträchtigter Hämostase ein sichereres Wirkungsprofil bieten. Eine pharmakologische Hemmung von FXIIa erscheint vor diesem Hintergrund als vorteilhafte Strategie und wird derzeit in präklinischen Studien vertieft untersucht. Aktuelle Studien in Tiermodellen belegen, dass die FXIIa-INH einen antithrombotischen Effekt ausübt, ohne die Hämostase zu beeinträchtigen [Hagedorn I et al. 2010; Larsson M et al. 2014; Matafonov A et al. 2014; Renné T et al. 2005].

Auch im Menschen verlängert sich die aPTT bei einem hereditären FXII-Mangel, ohne dass die Betroffenen unter einer Hämophilie leiden [Ratnoff OD et al. 1961]. Vergleichbar dazu konnte in FXII-K.O.-Mäusen beobachtet werden, dass die physiologische Hämostase unbeeinträchtigt ablief, während die aPTT verlängert und das dreidimensionale Thrombuswachstum in der Propagationsphase gestört war. Daher waren die Tiere vor einer okklusiven Thrombose geschützt [Renné T et al. 2005]. Nach einer Applikation von humanem FXII ging der antithrombotische Effekt in den FXII-K.O.-Mäusen verloren, was auf eine Übertragbarkeit des Mausmodells auf den humanen Organismus hindeutet [Kleinschnitz C et al. 2006; Renné T et al. 2005].

Venöse Thromboseerkrankungen

Eine venöse Thrombose entsteht klassischerweise durch degenerative Prozesse an der Gefäßwand, Störungen der Hämodynamik (Blutstase) und eine veränderte Zusammensetzung der Blutbestandteile (Hyperkoagulabilität), auch als Virchow Trias bekannt. Die häufigsten venösen Thrombosen sind tiefe Beinvenenthrombosen (TBVT). Eine besondere Gefahr liegt in der Embolisierung von thrombotischem Material im venösen System, denn sie können im Anfangsstadium asymptomatisch verlaufen. Daher tritt bei etwa 30 % der Patienten als Folgekomplikation eine Lungenembolie auf.

Dabei embolisiert thrombotisches Material, gelangt über den Blutkreislauf in die Lunge und verursacht dort durch die Blockade der Blutzufuhr eine Ischämie. Die Letalität der frühen Phase bei einer Lungenembolie ist sehr hoch und zusammen betrachtet liegt die jährliche Inzidenz für eine TBVT oder Lungenembolie in den USA bei etwa 900.000 Patienten. An den Folgen einer Lungenembolie sterben jährlich ca. 300.000 Menschen in den USA [Roger VL et al. 2012]. In der Gruppe der lebensbedrohlichen kardiovaskulären Erkrankungen liegt die Lungenembolie auf Platz drei [Nielsen JD 2013]. Daher stellt die venöse Thrombose ein ernstzunehmendes Problem für die Betroffenen dar.

Zur den pathophysiologischen Abläufen ist bisher bekannt, dass der reduzierte Blutfluss eine Hypoxie des Endothels einleitet, woraufhin endotheliales P-Selektin exprimiert wird. Durch eine Adhäsion von Monozyten und neutrophilen Granulozyten an das P-Selektin heften sich erste aktivierte Thrombozyten, die die Thrombose an der Gefäßwand vorantreiben. Weitere Immunzellen adhärieren an dieser Stelle und unterstützen nach ihrer Aktivierung die Koagulation durch unterschiedliche Strategien [von Brühl ML et al. 2012]. Monozyten exprimieren TF, sodass die extrinsische Gerinnung aktiviert wird. Die Aktivierung von Neutrophilen resultiert in vielfältigen Prozessen. Es gibt Hinweise dafür, dass Neutrophile nach einer Endothelverletzung die Hauptquelle des aus dem Blut stammenden TF in der frühen Phase der Koagulation darstellen [Darbousset R et al. 2012]. Außerdem sezernieren aktivierte Neutrophile „*Neutrophil Extracellular Traps*“ (NETs). NETs sind aus extrazellulären Chromatinfasern aufgebaut mit einem Rückgrat aus Histonproteinen [Brinkmann et al. 2004]. Durch ihre prokoagulante Oberfläche aus anionischer, dekondensierter DNA fördern NETs die Plättchen-Aktivierung. Des Weiteren wird zurzeit diskutiert, dass NETs als Oberfläche zur Aktivierung von FXII in der Propagationsphase der Thrombose eine Rolle spielen [Fuchs TA et al. 2010; von Brühl ML et al. 2012]. FXII kann außerdem direkt an diese Immunzellen binden, wodurch die intrinsische Koagulation FXIIa-vermittelt eingeleitet wird. Diese Prozesse ergänzen sich und treiben die venöse Thrombose voran.

Patienten mit den typischen Risikofaktoren für die Ausbildung einer venösen Thrombose wie Bewegungsmangel, Übergewicht und einer Thrombose in der Anamnese werden prophylaktisch antikoaguliert. Die größte Gruppe mit der Indikation zur Thromboseprophylaxe besteht vermutlich aus immobilisierten Patienten im Krankenhaus, zum Beispiel nach größeren Operationen. Die gängigsten Medikationen sind dabei Heparin, Vitamin-K-Antagonisten sowie Inhibitoren von Thrombin und FXa [Buller HR et al. 2012; Kyrle PA et al. 2005]. Für die akute Therapie einer venösen Thromboembolie kann in schweren Fällen eine Thrombolyse mit rt-PA durchgeführt werden [Wells PS et al. 2014]. Bei der pharmakologischen Prophylaxe gelten prinzipiell die gleichen Nachteile, wie in der arteriellen Thromboseprophylaxe, da sie nur bedingt steuerbar sind und das Risiko einer Blutungsneigung erhöhen.

1.4.2 Kontaktphasen-Aktivierung in Systemen der extrakorporalen

Zirkulation

Eine Thrombose kann durch eine Gefäßverletzung von außen, eine Plaque-Ruptur bei arteriosklerotischen Endothelveränderungen durch eine venöse Blutstase oder Stenose, aber auch durch den Kontakt mit fremden bzw. anionisch geladenen Oberflächen ausgelöst werden. Die Koagulation an Fremdoberflächen wie beispielsweise Glas, des Membranoxygenators einer ECMO oder künstliche Herzklappen wird über FXIIa vermittelt [Schmaier AH 2008; Vogler EA et al. 2009]. Um Thrombosen während des Einsatzes einer ECMO vorzubeugen, erhalten die Patienten hochdosierte Antikoagulanzen, die zwar einerseits die Koagulation im Pumpensystem verhindern, andererseits jedoch mit einem massiv erhöhten Blutungsrisiko einhergehen.

Anwendungen der extrakorporalen Zirkulation (EKZ)

Die extrakorporale Zirkulation (EKZ) wird als eine lebenserhaltende Maßnahme bei Patienten mit schwerwiegenden Funktionsstörungen von Herz oder Lungen angewendet. Dabei wird über ein Pumpsystem die Blutzirkulation einzelner Organe bzw. des Körperkreislaufs für eine limitierte Zeit sichergestellt. Durch eine Katheterisierung wird das venöse Blut aus dem Körper in die künstliche Lunge geleitet, wo die Oxygenierung des Blutes stattfindet. Um Druckveränderungen durch eine potenzielle Fremdoberflächen-induzierte Thrombose zu messen, befindet sich vor und hinter dem Oxygenator ein Druckmesspunkt. Bevor das mit Sauerstoff angereicherte Blut zurück in den Kreislauf gelangt, wird es gefiltert. Für komplexe Operationen am offenen Herzen oder kardialen Gefäßen wird

meist die Herz-Lungen-Maschine (HLM) eingesetzt. Sie übernimmt die komplette kardiale und/oder pulmonale Funktion, während der Operateur beispielsweise einen Bypass der Koronararterien legen kann. Die Unterstützung der Kreislauffunktion über die HLM kann im zeitlichen Rahmen von einigen Stunden bis zu wenigen Tagen aufrecht erhalten werden [Reul HM et al. 2000].

Die extrakorporale Membran-Oxygenierung (ECMO) ist technisch analog zur HLM, kann jedoch für bis zu 30 Tage die kardiale und / oder die pulmonale Funktion ersetzen [Peek GJ et al. 1999]. Dies gibt dem geschädigten Gewebe (Herz oder Lunge) die Möglichkeit ohne Belastung abzuheilen [Marasco SF et al. 2008]. Die ECMO wird häufig in Neugeborenen mit einer respiratorischer Insuffizienz oder einem septischem Schock angewendet [Dalton HJ 2011]. Außerdem kann sie in allen Altersgruppen im Fall eines akuten Herz- oder Lungenversagens eingesetzt werden [Formica F et al. 2010]. Für die ECMO-unterstützte Zirkulation in der Herzchirurgie werden relativ hohe Flussraten benötigt, daher werden größere Katheter als bei der HLM verwendet, die zumeist veno-arteriell mit dem Kreislauf verbunden werden. Außerdem werden in der ECMO niedrigere Dosierungen zur Antikoagulation appliziert, um Hämorrhagien während der verlängerten Phase der extrakorporalen Zirkulation zu vermeiden [Peek GJ et al. 1999]. Um dennoch das Thrombose-Risiko zu reduzieren, werden Silikon- oder Heparin-beschichtete Oxygenatoren verwendet [von Segesser LK 1999].

Alle Maßnahmen der EKZ sind ein massiver invasiver Eingriff, der für sich allein schon mit lebensbedrohlichen Risiken einhergeht. Darüber hinaus wird er nur bei kritisch erkrankten Patienten angewendet [Müller T et al. 2013]. Die Risiken schließen außer einer Verletzung der kanülierten Gefäße mechanische und systemische Komplikationen mit ein. Zu den wichtigsten mechanischen Komplikationen zählt eine Koagulation innerhalb des Systems, beispielsweise die Thrombose des Oxygenators. Es wurden schon Thrombosen der Oxygenator-Membran trotz einer systemischen Antikoagulation beobachtet [Müller T et al. 2013]. Dies verdeutlicht den medizinischen Bedarf eines neuen antithrombotischen Therapieansatzes, der speziell die Fremdoberflächen-induzierte Thrombose hemmt.

Die wichtigsten den Patienten systemisch beeinflussenden Komplikationen sind eine Plättchen-Deposition an den Schläuchen des Systems, durch Antikoagulation geförderte Hämorrhagien, die Gerinnungsaktivierung und Inflammation sowie ein erhöhtes Risiko für eine Heparin-induzierte Thrombozytopenie [Müller T et al. 2013].

Faktor XII-vermittelte Thrombose in der extrakorporalen Zirkulation

Da in der vorliegenden Arbeit die Rolle der FXII-vermittelten Thrombose an Fremdoberflächen untersucht wird, wird im Folgenden der Fokus auf die thrombotischen Prozesse während der EKZ gelegt. Trotz einer systemischen Antikoagulation und Heparin-beschichteter Oberflächen stellt die Thrombose in der ECMO eine ernstzunehmende Komplikation dar [Dornia C et al. 2013]. Durch den Kontakt zwischen Blut mit den verhältnismäßig großen Fremdoberflächen der Schläuche und nicht-physiologischen Scherkräften werden FXII-vermittelt Gerinnungs- und Entzündungsprozesse während der EKZ induziert [Peek GJ et al. 1999; Sniecinski RM et al. 2011]. Dabei ist der Oxygenator der EKZ als künstliche Lunge besonders anfällig für die Bildung von Thromben. Die große Oberfläche ist für den effizienten Gasaustausch obligat, jedoch fördert sie gleichzeitig die FXIIa-induzierte Gerinnungsaktivierung [Edmunds LH, Jr. 2002]. Prinzipiell lagern sich bei der Fremdoberflächen-induzierten Thrombose zunächst unspezifisch Plasmaproteine wie Albumin und Fibrinogen an der dem Blut zugewandten Seite der Fremdoberfläche ab. Mit der Zeit werden adhärierte Proteine durch affinere Plasmakomponenten verdrängt, was auch als Vroman-Effekt bezeichnet wird [Vroman L 1962]. Auf diese Weise wird Albumin durch Faktoren wie FXII und HK verdrängt. Dabei erfolgt die Autoaktivierung von FXII, wodurch nachfolgend und FXIIa-vermittelt Thrombin und Fibrin gebildet wird [Guo Z et al. 2006]. Unter hohen Fließgeschwindigkeiten wird der Proteinaustausch begünstigt [Wojciechowski P et al. 1991].

Weiterhin resultiert eine direkte Interaktion zwischen FXIIa und Fibrin in einer Versteifung und Verdichtung der Fibrinfibrillen des entstehenden Thrombus, wie Konings et al. *in vitro* nachgewiesen haben [Konings J et al. 2011]. Darüber hinaus aktiviert FXIIa TAFI, was eine Verzögerung der Fibrinolyse zur Folge hat [Guo Z et al. 2006; Latacha MP et al. 2004]. Es wird vermutet, dass dadurch die Thrombusmorphologie mit einer FXII-Aktivierung widerstandsfähiger gegen eine Thrombolyse ist.

Neben der Aktivierung von FXII spielt die Anlagerung von Thrombozyten an der Fremdoberfläche der ECMO eine Rolle. Die nachfolgende Aktivierung der Thrombozyten forciert die Gerinnungsreaktionen, was letztendlich über eine Fibrinbildung zu Mikrothromben und einer Thrombus-bedingten Okklusion des Oxygenators und der Katheter führen kann [Colman RW et al. 1987; Dutton RC et al. 1973; Peek GJ et al. 1999]. Weitere Risikofaktoren wie niedrige Flussraten bei geringem Blutvolumen, eine Stase des Blutes durch ein Blutreservoir und die Verwendung eines Koronarsaugers fördern zusätzlich eine Koagulation und Embolisierung während der EKZ [Brooker RF et al. 1998; Murphy GS et al. 2009].

Obwohl in allen Systemen der EKZ Filter Mikroemboli, Gasbläschen und Fremdpartikel das Eindringen in die Zirkulation verhindern, steigt besonders bei längeren Phasen die Gefahr der Embolisierung [Brown WR et al. 2000]. Denn trotz einer Antikoagulation mit Heparin können in etwa 20 % der Patienten vermehrt Thrombin und Fibrinospaltprodukte nachgewiesen werden [Peek GJ et al. 1999]. Das bedeutet, dass in der EKZ kontinuierlich eine Thrombinbildung und eine Fibrinolyse stattfinden, auch unter medikamentöser Antikoagulation.

Dennoch ist eine antikoagulative Therapie der Patienten essenziell, um die Thrombose zu reduzieren und eine Verbrauchskoagulopathie zu verhindern [Edmunds LH, Jr. 2002]. Unfraktioniertes Heparin ist das einzige in Deutschland zugelassene Antikoagulanz für die HLM [Deutsches Herzzentrum, Berlin; www.dhzb.de/de/wissenschaft/bivalirudin/]. Seine Wirkung lässt sich mittels Protamin neutralisieren [Pai M et al. 2012]. Dennoch zählen peri- und postoperative Blutungen nach einer Heparin-Antikoagulation zu den größten Risiken für den Patienten [Paden ML et al. 2013].

Durch die Protaminbehandlung zur Antagonisation von Heparin sind außerdem Embolien nach einer EKZ-Therapie in den Endstromgebieten eine häufige Komplikation. Diese Embolien verursachen zur prä-existenten Erkrankung weitere klinische Symptome mit milder bis schwerer Ausprägung [Gorlinger K et al. 2012; Groom RC et al. 2009]. Gelangen Mikroemboli in die zerebrale Vaskulatur, tragen sie durch eine verringerte Sauerstoffsättigung im Blut sowie hypoxische und inflammatorische Mechanismen zur Pathophysiologie des sogenannten „Pump Head“-Syndrom bei [Hoffman GM 2006; Newman MF et al. 2001; Slater JP et al. 2009]. Dies äußert sich beispielsweise in der milderen Form durch kognitive Defizite und in schwereren Fällen durch eine Lungenembolie oder einen Schlaganfall [Baufreton C 2010; Brown WR et al. 2000]. Die Inzidenz für einen post-operativen kognitiven Leistungsabbau liegt bei 60 % in Patienten, bei denen kurz zuvor ein herzchirurgischer Eingriff durchgeführt wurde [Slater JP et al. 2009].

Ein weiteres Problem entsteht durch die Induzierung inflammatorischer Prozesse im Rahmen der EKZ. Im kardiopulmonalen Bypass kann diese als systemische inflammatorische Reaktion („*systemic inflammatory response syndrome*“; SIRS) auftreten. Neben dem massiven Fremdoberflächen-Kontakt wird eine SIRS gefördert durch ischämische Reperfusions-Schäden und den traumatischen Eingriff [Paparella D et al. 2002]. Die Folgen des SIRS können sich als Koagulopathie, kardiale Funktionsstörung und multiples Organversagen manifestieren [Levy JH et al. 2003].

In der Akuten-Phase-Reaktion spielt die Aktivierung des KPS ebenfalls eine Rolle. Neben der Thrombinbildung induziert FXII inflammatorische Prozesse über eine BK-Freisetzung und die Aktivierung des

Komplementsystems [Paparella D et al. 2002]. Daraus resultiert die Bildung der chemotaktisch aktiven Anaphylatoxine C3a und C5a [Chenoweth DE et al. 1981]. Darüber hinaus fördert eine BK-vermittelte erhöhte Gefäßpermeabilität eine Ödembildung im Patienten [Regoli D et al. 1980].

Weiterhin ist zu erwähnen, dass die Behandlung mit Protamin zu Komplikationen führen kann, da Protamin aus dem Sperma bestimmter Lachsarten isoliert wird. Daher kann eine Heparin-Antagonisation mittels Protamin zu einer Unverträglichkeitsreaktion gegen die Fischeiweiße im Patienten führen kann [Brück S et al. 2014].

Darüber hinaus entwickeln 10 - 30 % der mit Heparin behandelten Patienten eine immunologische Intoleranz gegen Komplexe aus Heparin, Plättchenfaktor-4 und IgG, bekannt als Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT). Dieser Komplex bindet an einen thrombozytären Oberflächenrezeptor, was zur Plättchen-Aktivierung führt und die Plättchenzahl durch eine Verbrauchsreaktion massiv abfallen lässt [Sakr Y 2011].

Folglich ist der medizinische Bedarf nach einer optimierten Therapieoption groß [von Segesser LK 1999]. Denn herkömmliche Antikoagulanzen bewirken eine Hemmung der Thrombin- oder FXa-Funktion, sodass die Initiation des KPS von der Antikoagulation unbeeinträchtigt abläuft. Jedoch entstehen weiterhin Komplikationen durch eine erhöhte Blutungsneigung und die Einleitung inflammatorischer Prozesse. Aktuelle Forschungsprojekte konzentrieren sich auf eine reduzierte Thrombogenität der verwendeten Ausgangsmaterialien, um das Risiko von Mikroembolien und Hämorrhagien durch die systemische Antikoagulation zu reduzieren [von Segesser LK 1996].

Eine pharmakologische Hemmung von FXIIa stellt sich in diesem Zusammenhang als ein vielversprechender Ansatz dar. Von besonderer Wichtigkeit ist ein verbessertes Wirkungsprofil des antikoagulativen Ansatzes, um das Blutungsrisiko bei bestehender Antikoagulation zu reduzieren. Die FXIIa-Inhibition bietet eine neue Strategie, um die Fremdoberflächen-induzierte Thrombose in den Indikationen ECMO oder kardiopulmonaler Bypass zu reduzieren, ohne die assoziierte Blutungsneigung hervorzurufen. Des Weiteren könnten auch Patienten mit einer Unverträglichkeit gegen Heparin oder Protamin von dieser antithrombotischen Strategie profitieren.

1.5 Der ischämische Schlaganfall

Der ischämische Schlaganfall ist mit etwa 87 % der häufigste Schlaganfall-Typ und entsteht meist als Folge einer arteriosklerotischen Gefäßveränderung der *A. carotis* [Go AS et al. 2014; Menke J et al. 2010]. Nach einer Plaque-Ruptur an der entzündeten Gefäßwand bildet sich ein Thrombus, der durch hohe Scherkräfte von seinem Ursprungsort dislozieren kann (Embolisierung). Das Gerinnsel führt in der zerebralen Mikrovaskulatur zur Stenose oder Blockade des betroffenen Gefäßes. Die resultierende Minderperfusion geht mit einem Sauerstoff- und Nährstoffmangel einher, was in einer Infarzierung des betroffenen Hirngewebes mündet.

Die typischen Schlaganfall-Symptome treten durch die Ischämie-induzierte Nekrose der minderperfundierten Hirnareale auf. Sie können je nach Okklusionsort und -dauer variieren, beinhalten aber meist eine plötzliche, unilaterale Schwäche, ein faziales Taubheitsgefühl und Gleichgewichtsstörungen. Von dem ischämischen Schlaganfall wird der hämorrhagischen Schlaganfall und die transitorische ischämische Attacke (TIA) abgegrenzt. Bei dem hämorrhagischen Schlaganfall entsteht eine Minderperfusion durch die Ruptur eines zerebralen Gefäßes. Das ausgetretene Blut wirkt außerdem über Thrombin und Hämoglobin-Abbauprodukte toxisch und raumfordernd auf das umgebende Nervengewebe [Hua Y et al. 2007]. Etwa 10 bis 17 % aller Schlaganfälle werden durch eine Hämorrhagie verursacht [Weimar C et al. 2003]. Eine TIA äußert sich in den typischen Schlaganfall-Symptomen, wobei diese laut Definition jedoch weniger als 24 Stunden anhalten, meist jedoch weniger als 60 Minuten [Easton JD et al. 2009].

Der Schlaganfall (alle Typen) stand 2012 auf Platz 2 der weltweit häufigsten Todesursachen (Abbildung 7). In Deutschland starben 2012 insgesamt 58.925 Menschen an einer Erkrankung mit zerebrovaskulärer Ursache [Statistisches Bundesamt, Deutschland]. Neben der hohen Mortalität stellt die Krankheit Schlaganfall außerdem eine der Hauptursachen für die Entwicklung neuer körperlicher Behinderungen im Erwachsenenalter dar [Rothwell PM 2001]. Daher bedeutet ein Schlaganfall außer einer schweren Bürde für die Patienten zudem einen hohen finanziellen Aufwand des Gesundheitssystems für pflegerische und rehabilitative Maßnahmen [Feigin VL et al. 2014].

Obwohl das Risiko für einen Schlaganfall mit dem Alter steigt, kann er in jedem Alter auftreten. Eine Studie stellte 2009 fest, dass 34 % der ins Krankenhaus eingewiesenen Patienten mit Schlaganfall-Symptomen jünger als 65 Jahre alt waren [Hall MJ et al. 2012]. Die typischen Risikofaktoren für einen Schlaganfall sind Hypertonie, Rauchen, Fettstoffwechselstörungen, Übergewicht und Bewegungs-

mangel, Diabetes mellitus und Herzrhythmusstörungen. Darüber hinaus erhöht ein vorhergegangener Schlaganfall das Risiko eines erneuten Schlaganfalls [Charidimou A et al. 2013].

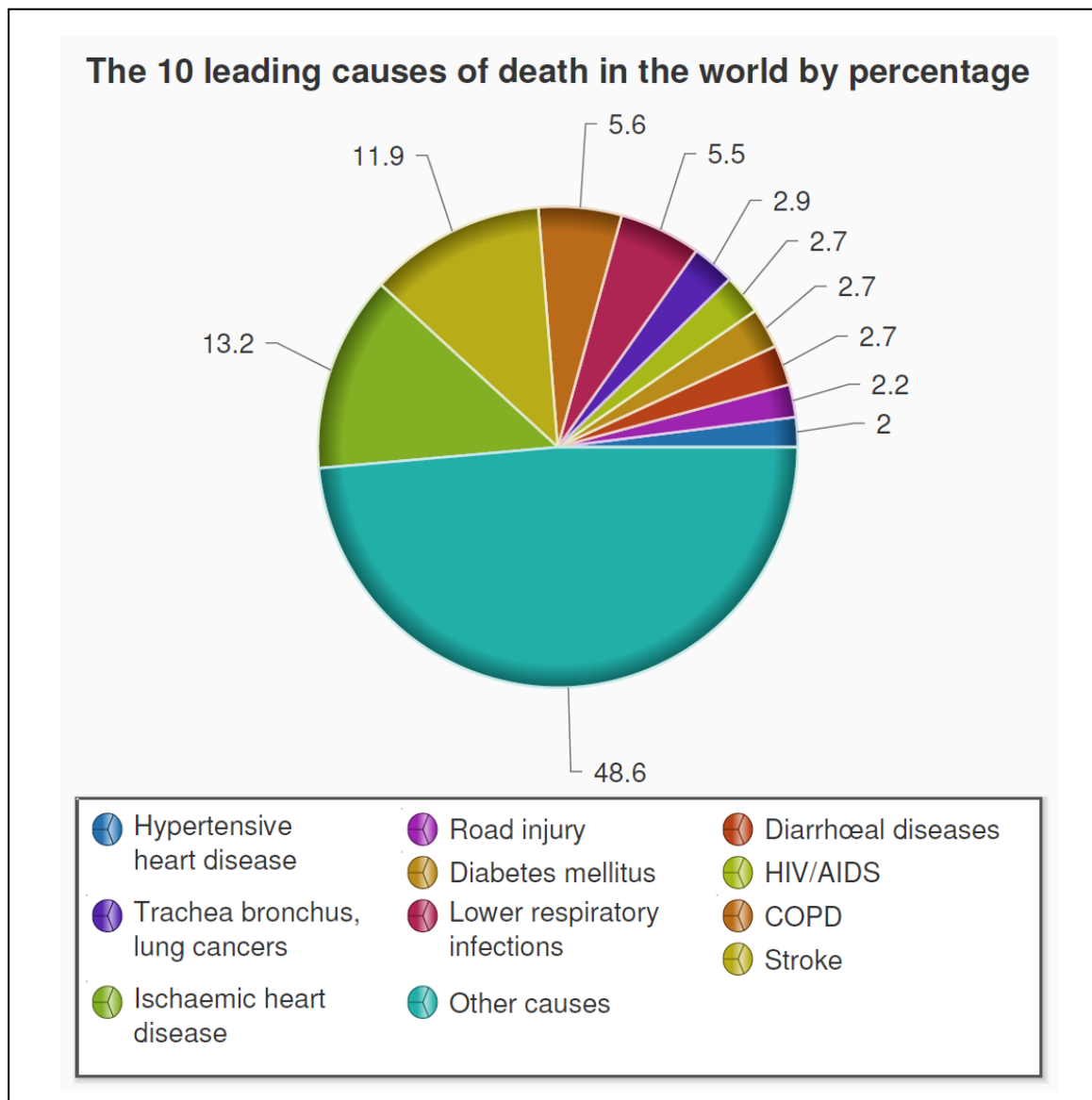


Abbildung 7: Die 10 häufigsten Todesursachen weltweit 2012

Darstellung der 10 häufigsten Todesursachen weltweit im Jahr 2012, prozentual nach ihrer Häufigkeit aufgetragen. Durch die globale Betrachtung sind Tumorerkrankungen vorrangig im Bereich „Trachea bronchus, lung cancers“ bzw. „Other causes“ mit einbegriffen.

Quelle: WHO Factsheets [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/]

1.5.1 Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls

Da das Gewebe des zentralen Nervensystems keine Energiespeicher besitzt, führt eine Minderdurchblutung innerhalb weniger Minuten zum Verbrauch der Energieträger wie Glukose, Sauerstoff und ATP. Wenn im ischämischen Kerngebiet der zerebrale Blutfluss weniger als 20 % beträgt, zieht das den nekrotischen Zelluntergang der betroffenen Neurone nach sich. Der Mangel an Sauerstoff und Nukleotidtriphosphaten wie ATP führt zum Zusammenbruch des transzellulären Ionengradienten, wodurch die einzelnen Zellen ihre natürlichen Schutz- und Überlebensfunktionen verlieren [Astrup J et al. 1981; Meuth SG et al. 2009]. Verstärkend kommt durch den Energiemangel eine Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) hinzu, die unter physiologischen Bedingungen ATP-abhängig von Mitochondrien abgebaut werden. Die akkumulierten ROS schädigen zelluläre Lipide, Proteine der Zellmembran, DNA und Enzyme durch eine unkontrollierte Oxidation [Love S 1999]. Zur Pathophysiologie trägt außerdem das Versagen der ATP-abhängigen Natrium-Kalium-Pumpen bei, die unter physiologischen Bedingungen den Ionengradienten zwischen Zelle und Interstitium aufrecht erhält. Durch ihre Dysfunktion depolarisiert die Nervenzellmembran, worauf hin sich die spannungsabhängigen Kalzium- und Natriumkanäle öffnen. Dies wiederum führt zur Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat. Da die Wiederaufnahme-Mechanismen für Glutamat ebenfalls ATP-abhängig sind, kann die exzitatorische Wirkung nicht beendet werden. Verstärkend erregt die Glutamatfreisetzung die Erregung der benachbarten Neurone, die ebenfalls einem ATP-Mangel ausgesetzt sind. Dieser Prozess ist auch als Streudepolarisation („*spreading depression*“) bekannt. Letztendlich kann die unkontrollierbare Übererregung der Zelle den Selbstzerstörungsmechanismus der Nervenzelle auslösen, was als Exzitotoxizität bezeichnet wird [Kleinschnitz C et al. 2012; Shah IM et al. 2009]. Der Mangel an Glukose und ATP sowie die Hypoxie in Kombination mit den nekrotischen Prozessen lösen außerdem lokal akute inflammatorische Prozesse mit Infiltration von Immunzellen aus [Iadecola C et al. 2011; Kleinschnitz C et al. 2013]. Die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren, wie zum Beispiel BK, resultiert in einer endothelialen Dysfunktion und fördert eine progressive Thrombose in der Mikrovaskulatur [Stoll G et al. 2008]. Dieser Prozess trägt außerdem zu dem als „*no-reflow*“-Phänomen bei, bei dem eine (spontane) Rekanalisation durch infiltrierende neutrophile Granulozyten und Mikrothromben erschwert wird [Boyle EM Jr. Et al. 1996; Molina CA et al. 2009]. Erschwerend kommt ein Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (BHS) hinzu, wodurch Blut ins ZNS übertritt. Wie eingangs erwähnt, wirken Thrombin- und Hämoglobin-Abbauprodukte ebenfalls neuro-

toxisch [Hua Y et al. 2007]. Die Ödembildung und Einblutung begünstigen durch eine Kompression des Nervengewebes die typischen Schlaganfall-Symptome [Ayata C et al. 2002].

Die Mechanismen hinter der BHS-Störung sind komplex und beinhalten ein Versagen der Ionenpumpen sowie die Einleitung von oxydativen und inflammatorischen Prozessen [Gasche Y et al. 2003]. Unter anderem trägt auch die Freisetzung des pro-inflammatorischen Mediators BK zur Ausprägung eines zerebralen Ödems bei [Kunz M et al. 2013].

Obwohl einige dieser Prozesse helfen, das Gewebe zu reorganisieren und Reparaturmechanismen zu initiieren, kann der unkontrollierbare Ablauf der Prozesse initiale Schäden noch verschlimmern [Faustino JV et al. 2011]. Wie bereits erwähnt geht auch die Rekanalisation des okkludierten Gefäßes mit der Einleitung pro-inflammatorischer und prokoagulanter Reaktionen einher. Zusammengefasst werden die durch eine Rekanalisation-vermittelten schädlichen Prozesse als „*Reperfusion-Injury*“ (RI). Durch die RI werden besonders die minderdurchbluteten Hirnareale gefährdet. Sie werden auch als „Penumbra“ (Schattenregion) bezeichnet, da sie durch arterielle Anastomosen residual von Blut versorgt werden. Trotz teilweise erhaltener metabolischer Funktion ist das Gewebe der Penumbra gefährdet durch Exzitotoxizität, inflammatorische Reaktionen und sekundäre Mikrothrombosen [Astrup J et al. 1981]. Wenn der untere Schwellenwert der Blutversorgung etwa 0,15 ml/g/min nicht unterschreitet und zeitnah eine Rekanalisation stattfindet, kann das betroffene Gewebe die ischämische Phase zeitweise überstehen [Back T 1998].

In der späten Phase nach der Entstehung des Infarktkerns unterliegt die Penumbra ohne Therapie einer Neurodegeneration durch apoptotische Prozesse [Ginsberg MD 2008]. Daher steht das Schlagwort „*time is brain*“ für eine schnelle Rekanalisation nach der Ischämie, um die gefährdeten Regionen funktionell zu erhalten [Saver JL 2006].

1.5.2 Behandlungsoptionen des ischämischen Schlaganfalls

Das einzige in Deutschland zugelassene Arzneimittel zur Thrombolyse nach einem abgeklärten ischämischen Schlaganfall ist rt-PA. Die Rekanalisation ist mittels rt-PA ist außerdem auf ein Zeitfenster bis maximal 4,5 h nach Auftreten der ersten neurologischen Defizite begrenzt [Hacke W et al. 2008; Leitlinien der DGN, 2009]. Dabei stellen die zeitnahe Krankenhaus-Einlieferung des Patienten und eine schnelle Diagnostik zur Abklärung der Ischämie die größten Herausforderungen dar. Bei Überschreitung dieses Zeitraums steigert eine rt-PA-Gabe das Risiko einer ICH, die alle Vorteile der Lysetherapie aufhebt. Zudem ist die Lysetherapie nur bei Patienten sinnvoll, die zur Zeit des Thera-

piebeginns nicht unter einer Hypertonie (systolischer Blutdruck > 185 mmHg) leiden. Daher erhalten weniger als 10 % aller Schlaganfallpatienten rt-PA [Adams RJ et al. 2008; Camerlingo M et al. 2005; Huang J et al. 2006; Paciaroni M et al. 2007]. Aber auch durch eine Behandlung mit rt-PA steigt die erfolgreiche Therapie-Rate im Vergleich zu einer Saline-behandelten Gruppen lediglich um 13 % [NINDS 1995; Wardlaw JM et al. 2000].

Eine alternative Behandlungsmethode ist eine mechanische Thrombektomie. Sie wird allerdings nur in Kombination mit rt-PA und bei Okklusion größerer intrakranieller Gefäße angewandt, da die dort lokalisierten Thromben häufig resistent gegen eine pharmakologische Thrombolyse sind [Berkefeld J et al. 2005].

Bei Patienten, in denen ein ischämischer Schlaganfall außerhalb des Zeitfensters diagnostiziert wird, beschränkt sich die akute Behandlung auf die Basistherapie zur Lebenserhaltung inklusive Antibiose und Antikoagulation zur frühen Sekundärprophylaxe [Leitlinie DGN 2009]. Dies macht deutlich, dass für die Therapie eines ischämischen Schlaganfalls der medizinische Bedarf an verbesserten Therapeutika mit optimiertem Wirkungsprofil enorm ist. Idealerweise könnte ein Präparat prophylaktisch oder auch nach der 4,5 h Zeitgrenze verabreicht werden, ohne Blutungskomplikationen zu begünstigen. Des Weiteren wäre eine neuroprotektive Komponente vorteilhaft, die die Ausbreitung der Penumbra verhindert. Ein möglicher Ansatz in diesem Sinne wäre eine Verbesserung der durch sekundäre Mikrothrombosen gestörten Reperfusion [Choudhri TF et al. 1998].

Verschiedene Ansätze werden zurzeit in präklinischen Studien auf ihre Eignung getestet. Darunter ist beispielsweise die therapeutische Hypothermie [Nagel S et al. 2008], eine prä-Konditionierung für eine erhöhte hypoxische Toleranz [Dunn JF et al. 2012] und Inhibitoren der Thrombozyten-Rezeptoren GPIb bzw. GPVI für eine verbesserte Antithrombose und Reperfusion [Stoll G et al. 2008].

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit dienten die Studien im experimentellen Schlaganfallmodell der Arbeitsgruppe um C. Kleinschnitz als Grundlage. Es konnte demonstriert werden, dass FXII-defiziente Mäuse sowohl ein signifikant reduziertes Infarktvolumen, als auch markant geringere neurofunktionelle Defizite aufwiesen [Kleinschnitz C et al. 2006]. Bei einer Substitution der FXII-K.O.-Mäuse mit humanem FXII im Schlaganfallmodell ging der protektive Effekt verloren. Das weist darauf hin, dass die Abwesenheit von FXII zu dem verringerten Infarktvolumen und den verbesserten neurofunktionellen Defizite führt [Kleinschnitz C et al. 2006].

Auf dieser Grundlage wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die pharmakologische FXIIa-Inhibition im murinen experimentellen Schlaganfallmodell untersucht. Es war bereits von Hagedorn et al.

gezeigt worden, dass der spezifischen FXIIa-Inhibitor rHA-Infestin-4 (Kap. 1.5.2 und 1.6.2) einen neuroprotektiven Effekt im Schlaganfall-Modell ausübt [Hagedorn I et al. 2010].

Analog zu den Studien von Hagedorn et al. wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst ein prophylaktischer Behandlungsansatz mit einem monoklonalen Antikörper gegen FXIIa (Anti-FXIIa MAb 3F7; Kap. 1.6.2) getestet. Im Anschluss wurde außerdem rHA-Infestin-4 in einem therapeutischen Behandlungsansatz auf seine neuroprotektiven Eigenschaften untersucht.

1.6 FXIIa-Inhibitoren

1.6.1 In der Literatur beschriebene Faktor XII-Inhibitoren

Der unspezifische Kürbiskern-Protease-INH („*Pumpkin seed inhibitor*“) zeigt eine große Affinität zu β -FXIIa und bovinem Trypsin, wobei auch eine geringe inhibitorische Wirkung gegen humanes Plasmin und FXa demonstriert werden konnte [Hojima Y et al. 1982]. Bekannt als unspezifischer KPS-INH ist auch der Corn-Trypsin-INH, dessen Wirkung gegen Trypsin und FXII von Hojima und Mahoney publiziert wurde [Hojima Y et al. 1980; Mahoney WC et al. 1984]. Eine nur geringe inhibitorische Wirkung gegen FXIIa und Thrombin, dafür aber sehr affin zu FXa, Plasmin und Trypsin konnten Carter et al. 1990 für einen Kohlsaart-Protease-INH („*Cabbage seed inhibitor*“) demonstrieren [Carter TH et al. 1990].

Ulmer et al. publizierten die reversible Hemmwirkung von Ecotin, ein aus *E. coli* stammendes Protein. Seine Funktion ist nur teilweise bekannt. Es konnte jedoch eine Inhibition von FXIIa, Kallikrein und der leukozytären Elastase nachgewiesen werden [Ulmer JS et al. 1995].

MacQuarrie et al. erforschten das Histidin-reiche Glycoprotein (HRG), dessen physiologische Funktion bis dahin unbekannt war. HRG zirkuliert unter biologischen Bedingungen mit 2 $\mu\text{mol/L}$ im Plasma, kann aber auch aus thrombozytären α -Granula sezerniert werden. Ihre Studien demonstrierten, dass auch HRG ein spezifischer FXIIa-INH ist. MacQuarries Ergebnissen zufolge führt eine HRG-Defizienz sowohl in Menschen als auch in Mäusen zu einer Verkürzung der aPTT. Die Bindung von HRG an das FXII-Zymogen wird durch die Anwesenheit von Zink gefördert, wobei keine Inhibition der Faktoren FXIIa, FXI und FXIa stattfindet [MacQuarrie JL et al. 2011]. Da die meisten dieser aufgelisteten Protease-INH nur bedingt zur selektiven FXIIa-INH anwendbar sind, wurden pharmakologisch synthetisierte Präparate entwickelt. Tans et al. untersuchten den Peptid-INH D-Pro-Phe-Arg Chloromethylketon (PCK), der hauptsächlich Kallikrein hemmt. Dadurch wird indirekt die KK-vermittelte FXII(a)-Aktivierung

ung neutralisiert und zu geringen Teilen konnte auch eine FXI-Inhibition beobachtet werden [Ghebrehiwet B et al. 1983; Tans G et al. 1987].

Robert et al. präsentierten die neuartige Substanzklasse der 3-carboxamid-Coumarine als potente und selektive FXIIa-INHs. Die Arbeitsgruppe synthetisierte diesen nicht-peptidergen FXIIa-INH, um einen pharmakologischen Therapieansatz für eine Antikoagulation mit reduziertem Blutungsrisiko zu etablieren [Robert S et al. 2008].

Eine weitere Quelle für natürliche Antikoagulanzen sind blutsaugende Tiere. Um die Nährstoffe aus der Blutmahlzeit verdauen zu können, haben sie verschiedene Techniken zur Gerinnungshemmung entwickelt. Ein bekanntes Beispiel ist der Blutegel *Hirudo medicinalis*, aus dessen Speichel der Thrombin-INH Hirudin extrahiert wurde [Markwardt F 1956].

Aus dem Speichel der Zecke *Ixodes ricinus* wurde ein Protein vom Kunitz-Typ isoliert. Die rekombinante Herstellung des „*Ixodes ricinus Contact Phase Inhibitor*“ (Ir-CPI) ermöglichte seine umfassende Charakterisierung. Es konnte eine spezifische Interaktion zwischen Ir-CPI und den humanen KPS-Faktoren FXIIa, FXIa und Kallikrein *in vitro* über eine Verlängerung der aPTT gezeigt werden. Ergänzend wurde beobachtet, dass Ir-CPI in Modellen der arteriellen und venösen Thrombose in Mäusen und Ratten vor Thrombose schützt, ohne Blutungskomplikationen hervorzurufen [Decrem Y et al. 2009].

Außerdem isolierten Campos et al. aus dem Mitteldarm der Raubwanze *Triatoma infestans* den Protease-INH Infestin. Infestin ist ein nicht-klassisches Serpin des Kazal-Typs, setzt sich nativ aus zwei Domänen zusammen und besitzt eine Masse von ca. 13 kDa. Die cDNA kodiert für vier verschiedene Domänen. Das vollständige Infestin (Domäne 1 bis 4) inhibiert Trypsin, Thrombin, Plasmin, FXa und FXIIa [Campos IT et al. 2004]. Für die Domänen 1-2 wurde eine inhibitorische Wirkung gegen Trypsin und Thrombin beschrieben. Die Domäne 3 besitzt keine inhibitorische Aktivität. Die Inhibition von Plasmin, FXa und FXIIa wird über die Domäne 4 vermittelt [Campos IT et al. 2002; Campos IT et al. 2004].

Eine weitere selektive FXII-Hemmung wurde mittels der Antisense-Oligonucleotid-Technik untersucht. Dabei wird ein Oligonucleotid verwendet, welches konträr zur mRNA des FXII aufgebaut ist. Sobald das komplementäre Oligonucleotid an die zelluläre mRNA bindet, kann diese nicht mehr abgelesen werden. Als Folge wird FXII nicht synthetisiert und das Plasmalevel von FXII sinkt [Revenko AS et al. 2011]

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, speziell die FXIIa-vermittelte Aktivierung des FXI zu untersuchen. Dafür entwickelten Cheng et al. einen Antikörper, der die Zielstruktur von FXIIa auf FXI

blockiert. Auf diese Weise konnte exklusiv die FXIIa-vermittelte intrinsische Gerinnung studiert werden [Cheng Q et al. 2010; Matafonov A et al. 2014].

1.6.2 Spezifische FXIIa-Inhibitoren der Arbeitsgruppe

rHA-Infestin-4

Das ursprüngliche Infestin stammt aus der Raubwanze *Triatoma infestans*. Campos et al. konnten eine spezifische FXII-Hemmung für die rekombinant produzierte Domäne 4 des nativen Proteins (Infestin-4) demonstrieren. Die inhibitorische Dissoziationskonstante (K_i) des rekombinant synthetisierten r-Infestin 1-4 zu FXIIa betrug 78 pM. Darüber hinaus wurde eine g-ringere inhibitorische Wirkung von r-Infestin 1-4 gegen FXa mit K_i 59,2 nM und Plasmin mit K_i 1,1 nM beschrieben [Campos IT et al. 2002]. Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass die Hemmung von FXIIa und geringfügig auch von Plasmin und FXa über die vierte Domäne des rekombinant hergestellten Infestin-4 (r-Infestin 4) vermittelt wird. Die inhibitorische Wirksamkeit für K_i lag bei 128 pM [Campos IT et al. 2004].

Um Infestin-4 für die Erforschung der FXIIa-Funktionen einzusetzen, wurde in der Arbeitsgruppe *Recombinant Technology* in Marburg zunächst ein Synthese-Ansatz mit (His)₆-Tags zur Aufreinigung getestet. Jedoch zeigten pharmakokinetische Tests in Mäusen, dass die plasmatische Halbwertszeit des ursprünglichen Proteins mit (His)₆-Tag mit 20 min zu kurz war, um es in präklinischen Modellen als potentiell Therapeutikum einzusetzen [Hagedorn I et al. 2010]. Daher wurde das rekombinante Infestin-4 (7 kDa) mit humanem Albumin (HA; 66 kDa) fusioniert, wodurch eine hochgradig verbesserte Bioverfügbarkeit (8 % versus 92 %) und eine Halbwertszeit von 4,6 h in Mäusen nach i.v.-Gabe erzielt wurde. Das Produkt rHA-Infestin-4 wurde aus dem Überstand von transfizierten E. coli (TOP10, Invitrogen) gewonnen und mittels Immun-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt [Hagedorn I et al. 2010]. Für rHA-Infestin-4 konnte zunächst *in vitro* eine spezifische Wirksamkeit gegen FXIIa in Plasma von Maus und Ratte sowie in Standardhumanplasma von ca. 87 % nachgewiesen werden. Erst im massiven Überschuss (100-fach molar) zeigte rHA-Infestin-4 auch einen milden hemmenden Effekt auf FXa und Plasmin [Hagedorn I et al. 2010].

In der vorliegenden Arbeit wurde rHA-Infestin-4 angewendet, um die antithrombotischen Eigenschaften der Substanz in einem murinen Modell der Kontakt-induzierten Thrombose zu evaluieren. Zusätzlich wurde die Wirksamkeit von rHA-Infestin-4 in einem im murinen Schlaganfallmodell un-

tersucht. Diese Studie schließt mit einem therapeutischen Behandlungsansatz an die prophylaktische Gabe von Hagedorn et al. an [Hagedorn I et al. 2010].

Anti-FXIIa MAb 3F7

Der anti-FXIIa MAb 3F7 wurde vom gentechnischen Labor in Melbourne mittels Phagen-Display Technik hergestellt. Dazu wurden in einer Phagen-Bibliothek humane Fab-Fragmente mit hoher Affinität zu β -FXIIa identifiziert und zu einem voll funktionsfähigen humanen IgG4 rekonstruiert. Die monoklonalen AK wurden aus 293-T Zellen gewonnen und mittels Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt [Larsson M et al. 2014].

Auf die Weise konnte ein gegen den humanen Faktor β -FXIIa gerichteter monoklonaler Antikörper mit einem Molekulargewicht ca. 150 kDa produziert werden. Im Anschluss wurde *in vitro* seine FXIIa-neutralisierende Wirkung im Plasma von verschiedenen Spezies überprüft. Die größte Wirksamkeit entfaltete der Antikörper im Plasma von Kaninchen, gefolgt von humanem Plasma. Auch in murinem Plasma inhibiert anti-FXIIa MAb 3F7 die FXIIa-Funktion [Larsson M et al. 2014].

1.6.3 Vorarbeiten zur pharmakologischen FXIIa-Inhibition

Für die Erforschung der Funktion von FXII *in vivo* war die Herstellung der FXII-K.O.-Mäuse durch Pauer et al. ausschlaggebend [Pauer HU et al. 2004]. Trotz der FXII-Defizienz sind die FXII-defizienten Tiere normal lebensfähig und phänotypisch nicht von den Kontrolltieren zu unterscheiden. Jedoch zeigen sie eine signifikante Verlängerung der Kontakt-induzierten aPTT. Dies spiegelt die Parallelen zu Menschen mit einer FXII-Defizienz wieder, die außer einer verlängerten aPTT asymptomatisch sind und im Gegensatz zu einer Defizienz anderer Gerinnungsfaktoren wie FVIII keine erhöhte Blutungsneigung aufweisen [Ratnoff OD et al. 1955].

Faktor XII-Defizienz in Thrombosemodellen

Die Herstellung der FXII-K.O.-Mäuse ermöglichte zu erforschen, welche Bedeutung die intrinsische Koagulationskaskade für die physiologische Hämostase hat. Die umfangreiche Charakterisierung der FXII-K.O.-Mäuse zeigte keine erhöhte Blutungsneigung oder Thrombosen in den Organen, die Anzahl der peripheren Blutzellen unterschied sich nicht von den normalen Tieren, und die PT war ebenfalls im Normbereich [Renné T et al. 2005]. In einem durch Thrombozyten-Stimulation beschleunigten Gerinnungstest *in vitro* konnte keine beschleunigte Gerinnung des FXII-defizienten Blutes nachge-

wiesen werden. Daher schlossen Renné et al., dass aktivierte Thrombozyten an der FXII-vermittelten Koagulation beteiligt sind. Zudem wurden die FXII-defizienten Mäuse dem Schwanzblutungstest unterzogen, um die hämostatische Kapazität zu überprüfen. Es wurde kein Unterschied in der Zeit bis zur Hämostase detektiert bei den Gruppen der FXII-K.O.-Mäuse und der Wildtyp-Mäuse. Auch eine Substitution mit humanem FXII (2 µg/g) beeinflusste die Zeit bis zur Hämostase nicht [Kleinschnitz C et al. 2006].

Im nächsten Schritt wurden die FXII-K.O.-Mäuse in Thrombosemodellen genauer untersucht. Es konnte demonstriert werden, dass die Abwesenheit von FXII einen protektiven Effekt im letalen Lungenembolie-Modell besitzt [Renné T et al. 2005]. Das Modell leitet die thrombotischen Prozesse Kollagen-vermittelt ein. In den FXII-K.O.-Mäusen wurde eine verringerte Zahl okkludierter Gefäße beschrieben, was auf eine gestörte Thrombusbildung hindeutet. Diese Hypothese wurde in einer Folge-Studie zur arteriellen Thrombose vertieft. Dafür wurden drei Maus-Modelle herangezogen: (1) Die FeCl₃-induzierten Thrombose der mesenterialen Arteriolen, (2) Das Aortenkompressionsmodell mit einem mechanischen Thrombose-Stimulus und (3) Das Carotis-Ligaturmodell, ebenfalls mit einem mechanischen Thrombose-Reiz. In allen drei Modellen wurde ein protektiver Effekt durch die Abwesenheit von FXII demonstriert. Dabei waren alle FXII-K.O.-Mäuse vor der Entstehung stabiler und Gefäß-verschließender Blutgerinnsel geschützt. Die initiale Plättchen-Adhäsion an der geschädigten Stelle des Gefäßes verlief jedoch in allen Gruppen normal [Renné T et al. 2005]. Darüber hinaus konnten Renné et al. beobachten, dass eine Rekonstitution der FXII-K.O.-Mäuse mit humanem FXII (2 µg/g) die thrombotische Kapazität der FXII-defizienten Mäuse im FeCl₃-induzierten Thrombosemodell vollständig wieder herstellte [Renné T et al. 2005].

Darauf aufbauend wurde der spezifische FXIIa-INH rHA-Infestin-4 in einem FeCl₃-induzierten Thrombose-Modell in arteriellen Gefäßen getestet. Obwohl auch in der FXIIa-INH Gruppe eine initiale Plättchenadhäsion *in vivo* beobachtet werden konnte, entwickelte keines der Tiere einen Thrombus. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren waren die rHA-Infestin-4 behandelten Mäuse und Ratten in diesen Modellen vor okklusiven Thrombosen geschützt [Hagedorn I et al. 2010]. Synchron zur antithrombotischen Wirksamkeit von rHA-Infestin-4 in behandelten Mäusen (190 und 400 mg/kg) und Ratten (200 mg/kg) konnte gleichzeitig keine erhöhte Blutungsneigung festgestellt werden. Dies wurde mittels des Schwanzblutungstest überprüft [Hagedorn I et al. 2010]. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass rHA-Infestin-4 ein potenter Inhibitor der Thrombose unter arteriellen Flussbedingungen ist.

Faktor XII-Defizienz im murinen Schlaganfallmodell

Die FXII-K.O.-Mäuse wurden außerdem in einer Studie des experimentellen Schlaganfalls untersucht. Dabei wurde mittels der Filament-Methode eine transiente Ischämie mit RI herbeigeführt, die die thrombo-inflammatorischen Prozesse einer Schlaganfall-Pathophysiologie simulieren [Kleinschnitz C et al. 2006]. Die Analyse der neurologischen Defizite erfolgte 24 h nach Einleitung der Ischämie.

Es konnte demonstriert werden, dass eine FXII-Defizienz nicht nur eine verringerte Ausbreitung des infarzierten Gewebes zur Folge hatte (Reduzierung des Infarktvolumens um 50 %, verglichen mit dem Wildtyp), sondern auch eindeutig reduzierte neurologische Defizite bei den FXII-K.O.-Mäusen zu beobachten waren. Die neurologischen Defizite wurden mittels des Bederson Scores bestimmt und der Grip Test wurde zur Evaluation der neuromotorischen Funktionalität und Koordination hinzugezogen [Kleinschnitz, C et al. 2006]. Um diesen Befund zu untermauern, wurde in einer weiteren Studie der unspezifischen FXIIa-INH PCK (Kap. 1.5.1) in der Dosierung 8 µg/g untersucht. Kongruent zu den aus den FXII-defizienten Mäusen gewonnenen Daten konnte auch für die pharmakologische FXIIa-Hemmung im selben Modell ein protektiver Effekt mittels PCK in Wildtyp-Mäusen beobachtet werden. Das Infarktvolumen war deutlich verringert und auch die neurologischen Defizite waren signifikant verbessert [Kleinschnitz, C et al. 2006].

Als potenziellen Mechanismus für den schützenden Effekt durch FXII-Defizienz konnten Pham et al. eine verbesserte Mikroperfusion der ischämischen Areale in FXII-defizienten Mäusen mittels Magnet-Resonanz-Imaging-Technik demonstrieren [Pham M et al. 2010]. Dies limitiert die Ausbreitung der Penumbra und der Reperfusionsschäden, was letztendlich zu einer Neuroprotektion beiträgt.

Des Weiteren wurde der spezifische FXIIa-INH rHA-Infestin-4 in dem gleichen Schlaganfallmodell der Filament-Methode in Mäusen getestet. Die Analyse-Parameter wurden wie bei den FXII-K.O.-Mäusen gewählt. Für den prophylaktischen Behandlungsansatz (200 mg/kg rHA-Infestin-4) konnte hier ebenfalls ein reduziertes Infarktvolumen beobachtet werden, das mit einer Verbesserung der neurologischen Defizite einherging [Hagedorn I et al. 2010].

Diese vielversprechenden Ergebnisse sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit um eine durch anti-FXIIa MAb 3F7-vermittelte FXII-Inhibition ergänzt werden. Dafür wurde die Wirksamkeit des anti-FXIIa MAb 3F7 im murinen experimentellen Schlaganfall in einer prophylaktischen Applikation untersucht. Außerdem wurde ergänzend zum prophylaktischen ein therapeutischer Behandlungsansatz von rHA-Infestin-4 im murinen Schlaganfallmodell durchgeführt.

2. ZIEL DER ARBEIT

Das Ziel dieser Arbeit war es, die von der Firma CSL zur Verfügung gestellten FXIIa-Inhibitoren rHA-Infestin-4 (CSL Behring GmbH, Deutschland) und anti-FXIIa MAb 3F7 (CSL Limited, Australien) in verschiedenen Tiermodellen zu charakterisieren. Diese Arbeit ist ein Beitrag zu einem komplexen Forschungsprojekt zur umfassenden Charakterisierung der Testsubstanzen in verschiedenen klinischen Anwendungsoptionen. Die FXIIa-Inhibitoren sollten auf ihre antithrombotische Wirksamkeit in den Spezies Maus und Kaninchen untersucht werden. Dafür wurden Thrombosemodelle eingesetzt, die die Thrombusbildung auf mechanischer, chemischer und Fremdoberflächen-aktivierter Basis induzieren.

Zusätzlich sollte der Effekt der FXIIa-Inhibition in einem Mausmodell des ischämischen Schlaganfalls untersucht werden. Dabei wurde die präventive Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 in Bezug auf Infarktvolume, neuromotorische Funktionalität und auf molekularer Ebene untersucht. Basierend auf den nachgewiesenen Effekt einer prophylaktischen Behandlung sollte die therapeutische Wirkung von rHA-Infestin-4 im ischämischen Schlaganfallmodell untersucht werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

Im Folgenden werden die Prinzipien und Durchführungsprotokolle der einzelnen Methoden beschrieben. Alle Tierversuche wurden mit der Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen bzw. des Regierungspräsidiums von Unterfranken und entsprechend des geltenden deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. In jeder Studie wurde die minimal benötigte Tierzahl eingesetzt, um eine valide Aussage über den Ausgang der Behandlung treffen zu können. Als Entscheidungsbasis zum Volumen der Blutentnahme dienten die Richtlinien der GV-SOLAS. Unmittelbar vor dem Experiment wurde jedes Tier gewogen, um die adäquate Applikationsdosis zu berechnen. Alle Kontrolltiere erhielten standardisiert das gleiche Volumen der Kontrollsubstanz pro Gewicht, wie die mit FXIIa-INH behandelten Gruppen.

3.1 Übersicht über alle Studien dieser Arbeit

Spezies	Modell	Behandlungs- ansatz	Substanz	Dosis	N =
Maus	Aortenkompression	Prophylaktisch	Anti-FXIIa MAb 3F7	10 mg/kg	5
				20 mg/kg	11
Maus	Venöse Thrombose	Prophylaktisch	Anti-FXIIa MAb 3F7	10 mg/kg	10
Maus	Arteriovenöser Shunt	Prophylaktisch	rHA-Infestin-4	200 mg/kg	10
			Anti-FXIIa MAb 3F7	10 mg/kg	10
Kaninchen	Arterielle und venöse Thrombose, simultan	Prophylaktisch	Anti-FXIIa MAb 3F7	7 mg/kg	10
Kaninchen	Arteriovenöser Shunt	Prophylaktisch	Anti-FXIIa MAb 3F7	7 mg/kg	3
Maus	Ischämisches Schlaganfallmodell (tMCAO)	Prophylaktisch	Anti-FXIIa MAb 3F7	10 mg/kg	48
				20 mg/kg	33
				50 mg/kg	9
		Therapeutisch	rHA-Infestin-4	200 mg/kg	15

3.2 Thrombosemodelle in der Maus

Die Maus als ein Säugetier ist dem Menschen physiologisch ähnlich, insbesondere im Zusammenhang mit kardiovaskulären Krankheitsmodellen. Da sie häufig als Modellorganismus verwendet wird, sind erhaltene Studienergebnisse auch mit anderen Arbeiten vergleichbar. Außerdem bietet sich der Vorteil, dass sie durch ihre geringe Körpergröße nur wenig Substanzmenge benötigt. Die in der vorliegenden Arbeit angewandten Modelle sind wissenschaftlich anerkannt und bilden die Grundlage zur Erforschung neuer antithrombotischer Therapeutika.

Tierhaltung

Die Mäuse wurden bei einer maximalen Gruppengröße von 10 Tieren in einem Polycarbonat-Käfig Typ III gehalten. Die Käfigböden wurden mit entstaubtem Einstreugranulat bedeckt. Einmal pro Woche wurde das Futter gewechselt und bei Bedarf ergänzt. Das Trinkwasser wurde dreimal pro Woche erneuert. Die Mäuse unterlagen einen Hell-Dunkel-Rhythmus (12 h / 12 h). Die Raumtemperatur betrug 20 – 24 °C und die relative Luftfeuchte lag bei 40 – 50 %.

Narkose

Die standardisierte Mischung für die Narkoselösung bestand in 130 µL Ketamin (100 mg/mL), 130 µL Xylazin (2 %), 40 µL Vetranquil und 700 µL isotonischer Saline. Jede Maus erhielt von diesem Gemisch 5 mL/kg i.p. als Initialdosis. Die Narkosetiefe wurde regelmäßig mittels des Zwischenzehenreflexes überprüft. Bei Bedarf wurde bis zu 50 µL der Narkoselösung i.p. nachinjiziert. Soweit nicht anders beschrieben, wurde diese Narkoseform angewendet.

Betäubungsmittel	Firma
Ketamin 10 % (Ketanest)	CP-Pharma, Burgdorf, DE
Vetranquil® 1 % (Azepromazin)	Ceva Tiergesundheit GmbH, Düsseldorf, DE
Xylazin® 2 % (Rompun)	CP-Pharma, Burgdorf, DE

Material, Geräte und Substanzen für alle murinen Modelle

Material und Geräte	Firma
„Kompressionspinzette“	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DE
Augenschere OC 498	Aesculap AG , Tuttlingen, DE
Clip Applikator	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DE
Delicate Forceps - 0.4mm Tip Angled	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DE
Dumont Tweezers No. 5	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DE
Gefäß- und Fadenschere BC 157	Aesculap AG , Tuttlingen, DE
Gefäßclips Serrefine, 8 x 10 mm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DE
Glaselement	Borosilikatglas; Fa. Kobe, Marburg, DE
Perivascular Flowmeter Module TS420	ADInstruments, Oxford, UK
Mikroskop OPMI pico	Carl Zeiss, Jena, DE
Perma-Handseide, Ethicon (7,0)	Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, DE
Ultrasonic Flowprobe 0,5 PSB	ADInstruments, Oxford, UK
Ultrasonic Flowprobe 1,0 PSB	ADInstruments, Oxford, UK
LabChart® Pro Software	ADInstruments, Oxford, UK
Substanzen	Firma
Anti-FXIIa MAb 3F7	CSL Limited, Melbourne, Australien
Eisen-III-Chlorid (FeCl ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim am Albuch, DE
Heparin 2500 U	Ratiopharm GmbH, Ulm, DE
Isotonische Saline	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Natriumzitat (3,13%)	Eifelfango, Bad Neuenahr-Ahrweiler, DE
rHA-Infestin-4	CSL Behring GmbH, Marburg, DE

3.2.1 Aortenkompressionsmodell

Als Versuchstiere wurden 6 - 8 Wochen alte männliche Mäuse vom Stamm C57-BL/6 der Firma Janvier (Lyon, Frankreich) mit einem Körpergewicht von 20 - 25 g verwendet. Das Aortenkompressionsmodell basiert auf einer mechanischen Verletzung der *Aorta abdominalis*. Mittels einer Pinzette wird das Gefäß einer Kompression unterzogen, in deren Folge subendotheliale Matrixproteine freigelegt werden. Das induziert durch die Expression von TF die Einleitung der Gerinnungskaskade. Die Grundzüge des Modells wurden 1976 von Folts beschrieben und durch ihn selbst und weitere Arbeitsgruppen beständig an neue Fragestellungen angepasst [Folts J 1991; Folts JD et al. 1976; McGhie AI et al. 1994; Wu D et al. 2002]. Ursprünglich diente das Folts Modell zur Einleitung einer rekurrierenden Thrombose durch eine Stenose. Im Aortenkompressionsmodell wird das Modell modifiziert, sodass die mechanische Verletzung der Aorta zu einer stabilen thrombotischen Okklusion führt.

Durchführung des Aortenkompressionsmodells

Es wurde ein prophylaktischer Behandlungsansatz mit drei Versuchsgruppen gewählt. Die Kontrollgruppe erhielt isotonische Saline im gleichen Volumen wie die mit FXIIa-INH behandelten Gruppen. Die zweite Gruppe erhielt anti-FXIIa MAb 3F7 in der Dosis 10 mg/kg und die dritte Gruppe 20 mg/kg anti-FXIIa MAb 3F7. Die Testsubstanz wurde unmittelbar vor Beginn der Präparation i.v. appliziert. Im Anschluss daran wurde der Bauchraum der tief narkotisierten Maus eröffnet und die *A. abdominalis* frei präpariert. Das Gefäß wird in eine Ultraschall-Flusssonde (0.5 PSB) platziert, die über die gesamte Versuchsdauer den arteriellen Blutfluss aufzeichnet. Die thrombotische Okklusion wurde durch eine Quetschung des Gefäßes mit Hilfe einer Pinzette herbeigeführt (Abbildung 8 A). Unmittelbar im Anschluss wurde alle 15 sec die Flussrate notiert, über einen maximalen Beobachtungszeitraum von 30 min (Abbildung 8 B). Der Zeitpunkt der ersten vollständigen Okklusion wurde zur Auswertung herangezogen, wenn der Blutfluss länger als 2 min 0,00 mL/min betrug.

Diese Studie wurde in Kooperation mit dem Rudolf-Virchow-Zentrum der Universität Würzburg durchgeführt (Lehrstuhl für Experimentelle Biomedizin, Prof. Bernhard Nieswandt).

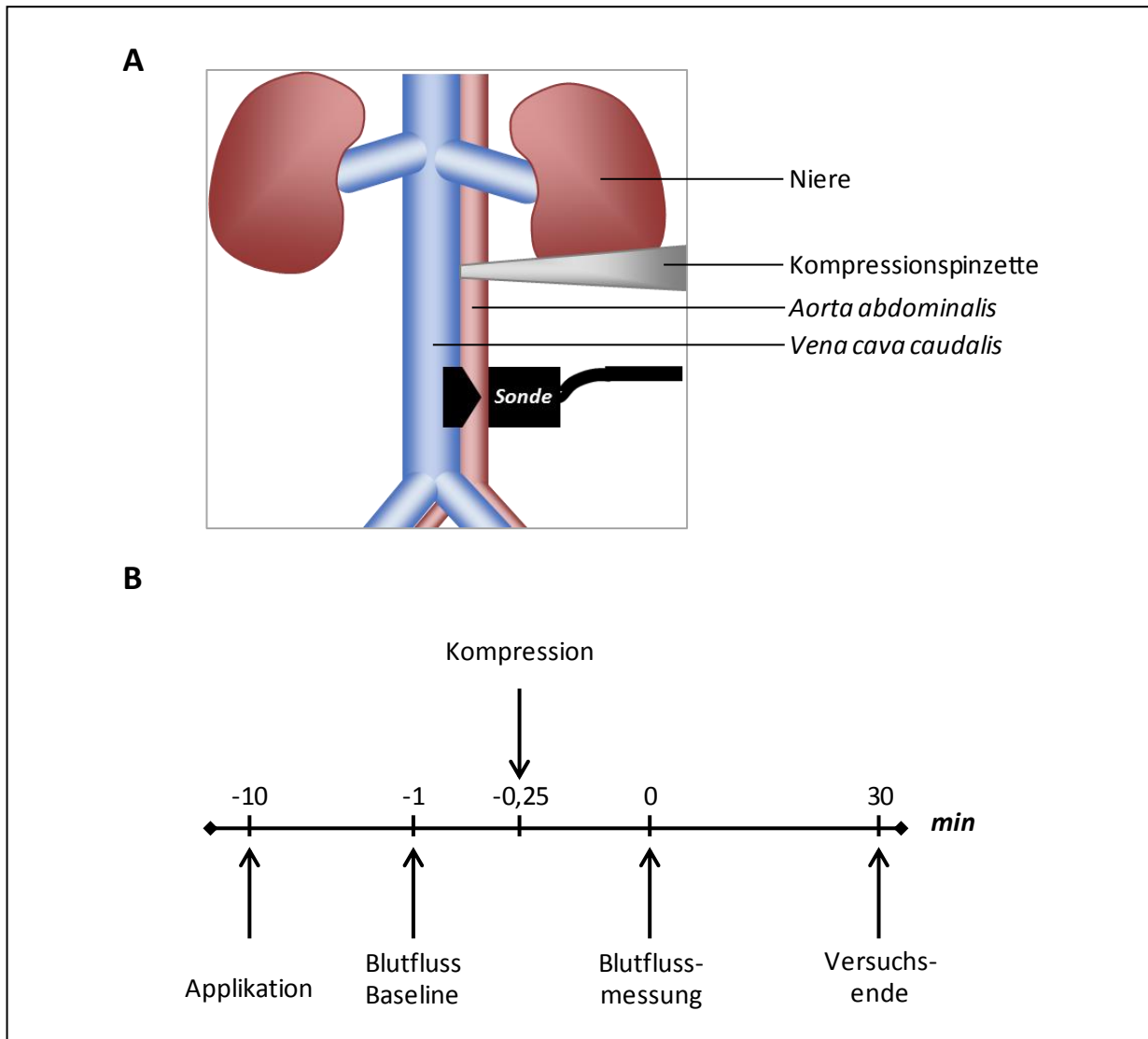


Abbildung 8: Darstellung des Aortenkompressionsmodells

A: Darstellung der experimentellen Situation in vivo. Nachdem über die Ultraschallsonde („Sonde“) die basale Blutflussrate der Aorta abdominalis bestimmt wurde, erfolgte kranial der Sonde die mechanische Kompression mittels einer Pinzette. Der Grad der Verletzung wurde makroskopisch evaluiert und alle 15 sec wurde die Blutflussrate notiert. **B:** Das Studiendesign zeigt auf einer Zeitschiene den Ablauf der Studie. Die applizierten Substanzen waren hier anti-FXIIa MAb 3F7 bzw. isotonische Saline zur Positivkontrolle in gleichem Volumen. Die Pfeile kennzeichnen den jeweiligen Aktions-Zeitpunkt.

3.2.2 Venöses Thrombosemodell

Als Versuchstiere wurden 7 bis 9 Wochen alte weibliche Mäuse vom Stamm NMRI der Firma Charles River (Sulzfeld, DE) mit einem Körpergewicht von 20 - 25g verwendet. In diesem Modell wurde FeCl_3 (5 %) zur Einleitung einer Thrombose eingesetzt. Durch die chemische Reizung entstehen im vaskulären Endothel zum einen ROS, die einen thrombogenen Reiz darstellen. Zum anderen wurde von Barr et al. demonstriert, dass eine initiale Anlagerung von Erythrozyten am Endothel Plättchen aus dem Blutstrom rekrutiert. Die aktivierten Thrombozyten fördern eine weitere Thrombozyten-Aggregation und leiten außerdem die Gerinnung ein, was letztendlich zusammen zur thrombotischen Okklusion des Gefäßes führt [Barr JD et al. 2013; Eckly A et al. 2011].

Durchführung des venösen Thrombosemodells

In einem prophylaktischen Behandlungsansatz erhielten 10 Tiere anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg). Eine zweite Gruppe (n = 10) wurde zur Kontrolle mit dem gleichem Volumen isotonischer Saline behandelt. Die Testsubstanz wurde unter Narkose unmittelbar vor Beginn der Präparation i.v. appliziert. Danach wurde der Bauchraum der tief narkotisierten Maus eröffnet und die *V. cava caudalis* frei präpariert. Die Baseline des venösen Blutflusses wurde mittels einer Ultraschall-Flusssonde (1.0 PSB) für 10 min aufgezeichnet. Anschließend wurde ein Wachspapierstreifen unter das Gefäß geschoben, um es zu exponieren. Ein Filterpapier (0,3 x 0,5 cm) wurde in 5 %-iger FeCl_3 -Lösung getränkt und für drei min auf der *V. cava caudalis* platziert (Abbildung 9 A). Unmittelbar im Anschluss wurde die Flussrate über das Programm Lab Chart® für 60 min aufgezeichnet. Der Zeitpunkt der ersten vollständigen Okklusion wurde zur Auswertung herangezogen. In Kombination mit der massiven Reduzierung der Flussamplitude wurde $\leq 0,02$ mL/min Flussrate für > 2 min als Okklusion definiert. Der Studienverlauf ist in Abbildung 9 B dargestellt.

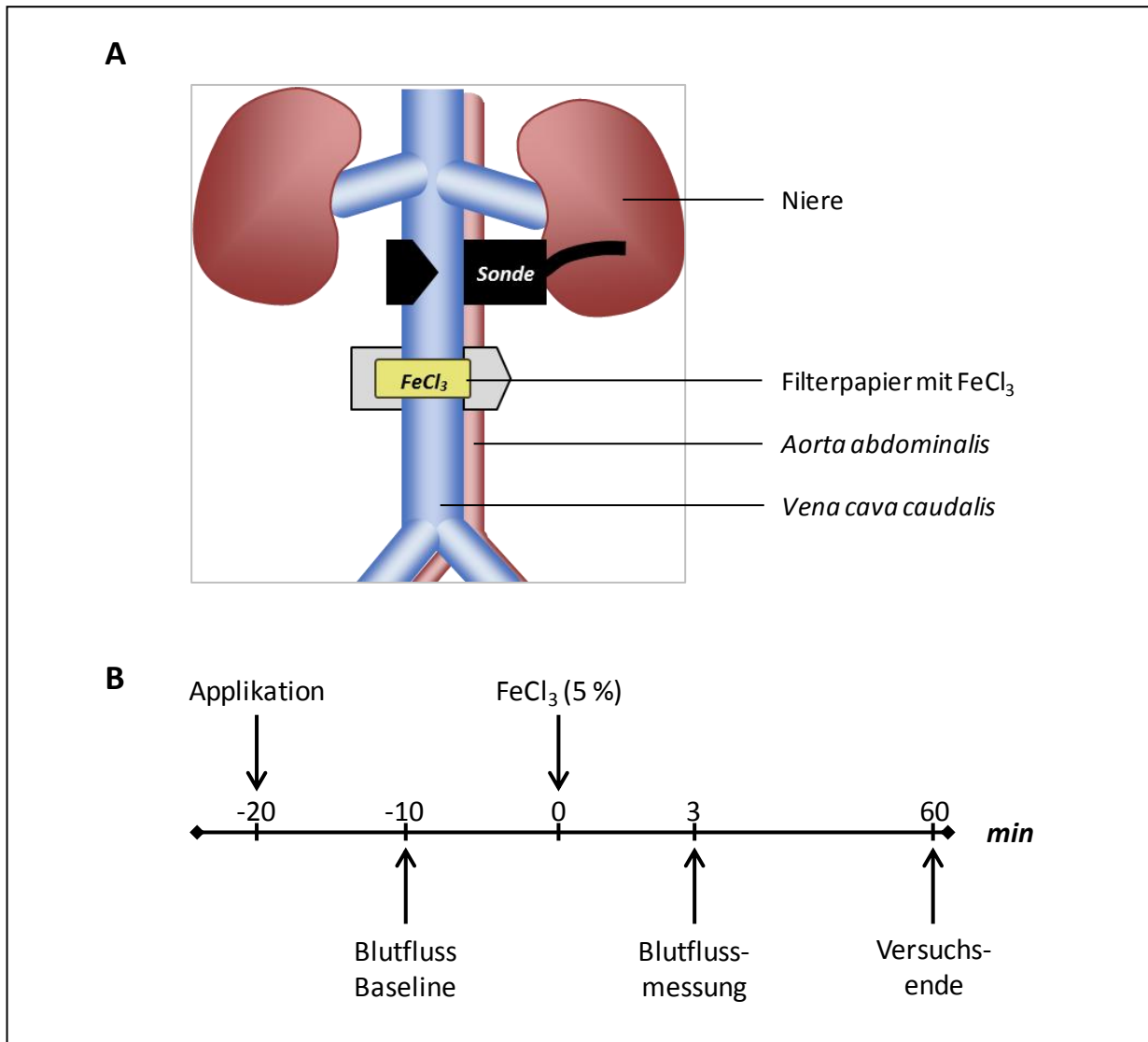


Abbildung 9: Darstellung des venösen Thrombosemodells

A: Darstellung der experimentellen Situation in vivo. Nachdem über die Ultraschallsonde („Sonde“) die basale Blutflussrate der V. cava caudalis bestimmt wurde, wurde die Sonde entfernt. Anschließend erfolgte die Induzierung der Thrombose mittels FeCl_3 (5%) für 3 min. Unmittelbar da-nach wurde die Vene wieder in der Sonde platziert und die Blutflussrate mit der Software LabChart® aufgezeichnet. **B:** Das Studiendesign zeigt auf einer Zeitschiene den Ablauf der Studie. Die applizierten Substanzen waren hier anti-FXIIa MAb 3F7 bzw. isotonische Saline zur Positivkontrolle in gleichem Volumen. Die Pfeile kennzeichnen den jeweiligen Aktions-Zeitpunkt.

3.2.3 Arteriovenöses Shunt Modell

Als Versuchstiere wurden weibliche Mäuse vom Stamm NMRI der Firma Charles River mit einem Körpergewicht von 25 - 30g verwendet. Das Alter der Tiere lag bei 7 - 9 Wochen bei Anlieferung. In diesem Modell wurde die Koagulation durch den Kontakt von Blut zu negativ geladenen Fremdoberflächen induziert (Abbildung 10). Als Fremdoberfläche diente ein Glaselement von ca. 3,5 cm (Borosilikatglas; Fa. Kobe Marburg, Einzelanfertigung; Abbildung 10 B), das an jedem Ende mit einem 4 cm langen Silikonkatheter verbunden wurde. Dieses System leitete den Blutfluss aus der *Aorta abdominalis* über das Glaselement in die *V. cava caudalis*, was im Folgenden als arteriovenöser (A/V) Shunt bezeichnet wird (Abbildung 10 A). Die Blutflussrate wurde kurz vor Wiedereintritt des Blutes in die Vene durch eine Ultraschallsonde am Silikonschlauch aufgezeichnet. Damit konnte der exakte Zeitpunkt einer thrombotischen Okklusion bestimmt werden. Als weitere Parameter zur Auswertung wurde außerdem das Nass- und Trockengewicht des aus dem Glas entfernten Thrombus bestimmt. Die Operationswunde wurde während des gesamten Versuches makroskopisch auf potenzielle Blutungsneigung begutachtet. Das Studiendesign wird in Abbildung 10 C dargestellt.

Durchführung

Es wurden 50 % (vol/vol) der Kontroll- oder Testsubstanz in den A/V Shunt als Priming-Lösung vorgelegt. Die restlichen 50 % (vol/vol) wurden wenige Minuten (5 - 7 min) vor Öffnung des A/V Shunts intravenös appliziert. In zwei separaten Studien wurde rHA-Infestin-4 (200 mg/kg) und anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) untersucht. In jeder Studie wurden Kontrolltiere mit eingeschlossen. Die Tiere zur Positivkontrolle erhielten isotonische Saline in gleichem Volumen, und eine weitere Gruppe erhielt Heparin (300 U/kg) zur Negativkontrolle. Der Beobachtungszeitraum betrug 30 min, falls keine Okklusion eintrat. Im Falle einer Okklusion wurde der Versuch 10 Minuten nach dem vollständigen thrombotischen Verschluss des Shunts beendet. Als Nachweis der Okklusion diente die Ultraschall-Flussmessung. Im Anschluss wurde der Thrombus aus dem Glaselement entnommen und gewogen. Bei der Operation wurde der Bauchraum in Narkose eröffnet und die *V. cava caudalis* sowie die *Aorta abdominalis* frei präpariert. Die Gefäße wurden vorsichtig voneinander getrennt. Die Arterie wurde in eine Ultraschall-Flusssonde (1.0 PSB) platziert. Nachdem die Sonde den arteriellen Blutfluss (Baseline) für 5 min aufgezeichnet hatte, wurde sie wieder entfernt. Anschließend wurden Knoten zum Fixieren des Katheters in der Arterie bzw. Vene vorbereitet. Die Arterie wurde möglichst weit kaudal ligiert. Direkt unterhalb des renalen Venenzuflusses wurde transient ein atraumatischer Gefäßclip (Serre-

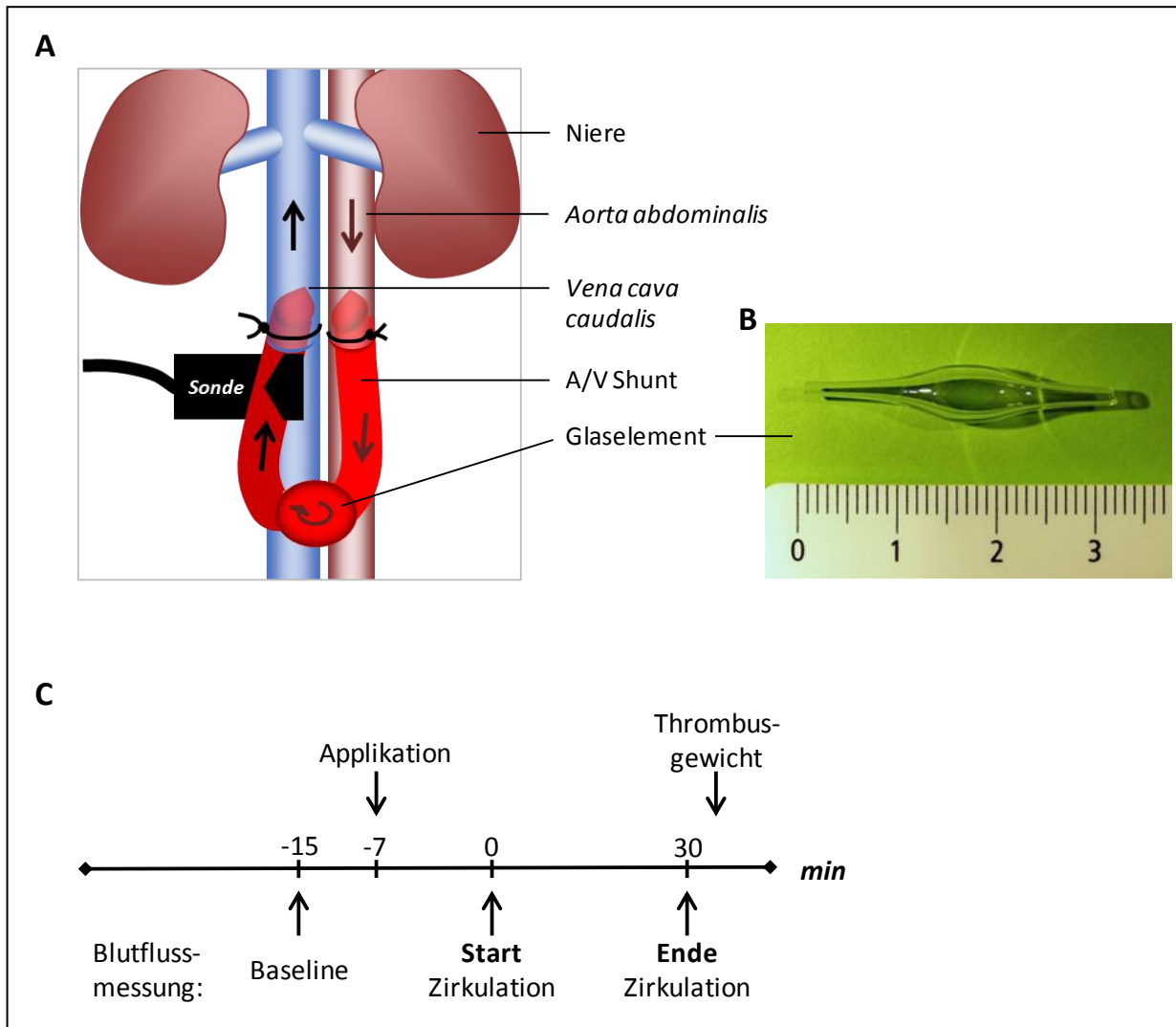


Abbildung 10: Das murine A/V Shunt Modell

A: Vereinfachte Darstellung des A/V Shunt-Modells in vivo. Nach Bestimmung der basalen venösen Blutflussrate wurde die Ultraschallsonde („Sonde“) entfernt. Der Zugang für den A/V Shunt wurde zuerst in der Aorta abdominalis geschaffen und anschließend in der V. cava caudalis. Der A/V Shunt mit Glaselement wurde vor der Kanülierung mit Priming-Lösung vorbefüllt. Die Sonde wurde am Silikonkatheter vor Wiedereintritt in die Vene platziert. Unmittelbar bei Start der Zirkulation durch den A/V Shunt wurde die Blutflussrate mit der Software von Lab Chart® aufgezeichnet. Die Pfeile kennzeichnen die Richtung des Blutflusses. **B:** Das Glaselement in 1,5-facher Vergrößerung. Die Skala des Lineals ist in cm angegeben. **C:** Darstellung des Studiendesigns. Die applizierten Substanzen waren hier rHA-Infestin-4, anti-FXIIa MAb 3F7, bzw. isotonische Saline und Heparin zur Kontrolle in gleichen Volumina. Auf einer Zeitschiene kennzeichnen Pfeile den Ablauf der Studie.

fine) gesetzt. Die Aorta wurde eröffnet, der zum Glaselement führende Katheter eingeführt und mit dem vorbereiteten Faden fixiert. Auf die gleiche Weise wurde auf der venösen Seite unter Zuhilfe-

nahme eines weiteren atraumatischen Clips ein Zugang geschaffen und der Katheter im Gefäß fixiert. Die Ultraschallsonde wurde kurz vor Eintritt des abführenden Katheters in die Vene am Silikon-schlauch platziert und das Programm Lab Chart® Pro (ADInstruments, UK) zur Aufzeichnung mittels Flowmeter TS420 (ADInstruments, UK) gestartet. Die Blutzirkulation durch den A/V Shunt begann mit der Entfernung der atraumatischen Clips und wurde für 30 min aufgezeichnet, oder für 10 min nach Auftreten einer vollständigen thrombotischen Okklusion. Lag der Blutvolumenstrom für > 2 min unter einem Wert von 0,02 mL/min, wurde die Okklusion als stabil bezeichnet.

3.3 Thrombosemodelle im Kaninchen

Um die Resultate der in der Maus durchgeführten Studien auf Anwendbarkeit im Menschen zu überprüfen, ist es sinnvoll die Versuche in weiteren Spezies durchzuführen. Daher wurde im Anschluss an die murinen Studien die Spezies Kaninchen als ein Nicht-Nagetier für weiterführende Studien der FXIIa-INH anti-FXIIa MAb 3F7 ausgewählt. Das Kaninchen bietet den Vorteil, dass durch das größere Blutvolumen auch mehrfache Blutentnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten möglich sind. Zudem konnte in internen Vorstudien mit Kaninchenplasma eine gute Wirksamkeit des anti-FXIIa-MAb 3F7 *in vitro* nachgewiesen werden.

Tierhaltung

Es wurden weibliche Chinchilla Bastard (CHB) Kaninchen mit einem Gewicht von 3 bis 4 kg verwendet. Lieferant war das Unternehmen M. Bauer Kaninchen (Neuenstein, DE). Die Tiere wurden einzeln in Käfigen gehalten, die einmal täglich gereinigt wurden. Das Futter wurde einmal wöchentlich erneuert und zusätzlich bei Bedarf ergänzt. Das Trinkwasser wurde täglich gewechselt. Die Tiere wurden bei einer Temperatur von 18-22 °C und einer relativen Luftfeuchte von 40-50 % gehalten. Zudem wurde eine Hell-Dunkel-Rhythmus (12 h/12 h) eingehalten.

Narkose

Die standardisierte Mischung für die Narkoselösung bestand in 2 mL Ketamin (100 mg/mL) mit 1 mL Xylazin (2 %) und 27 mL isotonischer Saline. Bei einem Kaninchengewicht von 2,5 - 3,0 kg wurde 1 mL als Initialdosis injiziert. Bei Bedarf wurde bis zu 2 mL der Narkoselösung nachinjiziert. Für die Aufrechterhaltung der Narkose wurden 8 - 12 mL/h des Narkosegemisches kontinuierlich infundiert.

Betäubungsmittel	Firma
Ketamin 10 % (Ketanest)	CP-Pharma, Burgdorf, DE
Xylazin® 2 % (Rompun)	CP-Pharma, Burgdorf, DE

Material, Geräte und Substanzen für alle Modelle im Kaninchen

Material und Geräte	Firma
Anatomische Pinzette	Aesculap AG , Tuttlingen, DE
Augenschere OC 498	Aesculap AG , Tuttlingen, DE
Clipzange	Chiro-Tech, Dautphetal-Allendorf, DE
Discofix	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Gebogene Knüpfpinzette	Aesculap AG , Tuttlingen, DE
Gefäßklemme nach Diefenbach	Aesculap AG , Tuttlingen, DE
Gefäßschere OC 498	Aesculap AG , Tuttlingen, DE
Glaselement	Otto E. Kobe KG, Marburg, DE
Haemoclip	Chiro-Tech, Dautphetal-Allendorf, DE
Infusionspumpe Apparatur 22	FMI, Elektronik-Havard Apparatus GmbH, Holliston, USA
Integrierte Heizplatte im OP-Tisch	Chiro-Tech, Dautphetal-Allendorf, DE
Introcan 22G/1	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Kaninchen OP-Tisch	FMI, Seeheim-Ober Beerbach, DE
Messbasis	ADInstruments, Oxford (UK)
Original Perfusor® Leitung	B Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Perma-Handseide, Ethicon (7,0)	Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt, DE
Skalpell mit Klinge 21	Aesculap AG , Tuttlingen, DE
Surgicutt®	ITC med N.J., USA
T61	Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, DE
Ultrasonic Flowprobe 1,5 PSB	ADInstruments, Oxford, UK
Verweilkanüle 22 G	B Braun, Melsungen AG, Melsungen, DE
Substanzen	Firma
Anti-FXIIa MAb 3F7	CSL Limited, Melbourne, AU
Heparin 2500 U	Ratiopharm GmbH, Ulm, DE
Isotonische Saline	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE

3.3.1 Simultanes arterielles und venöses Thrombosemodell

Im Modell der simultanen Thrombose wurden jeweils 10 CHB Kaninchen randomisiert den beiden Versuchsgruppen zugewiesen. Eine Gruppe erhielt anti-FXIIa MAb 3F7 (7 mg/kg) und zur Kontrolle erhielt die zweite Gruppe das gleiche Volumen pro Gewicht isotonischer Saline. In diesem Modell wurden zwei thrombotische Reize miteinander kombiniert. Die arterielle Thrombose beidseits an den *Aa. femorales* durch FeCl_3 (70 %) induziert (Abbildung 11). Dafür wurde das Tier in Narkose zunächst an der Innenseite der Läufe, die linke Halsseite und auf Höhe der linken Niere geschoren.

Anschließend wurde beidseitig entlang der Femuren ein etwa 5 cm langer Hautschnitt gesetzt, um den kranialen Teil der *Aa. femorales* frei zu präparieren. Die Arterien wurden vorsichtig von der daneben verlaufenden *V. femoralis* getrennt. Die Applikation des anti-FXIIa MAb 3F7 bzw. der isotonischen Saline erfolgte 5 min vor Beginn der Aufzeichnung. Anschließend wurde zum Zeitpunkt „0“ ein Filterpapier mit der FeCl_3 -Lösung für 60 min von oben auf die Arterie aufgebracht. Die Messung der Blutflussrate mittels Ultraschallsonde detektierte während der Messperiode von insgesamt 90 min den Blutvolumenstrom inklusive der Okklusionszeit (Abbildung 11 B).

Simultan zur arteriellen Thrombose wurde in der *V. jugularis* eine Stase durch Abklemmen eines etwa 30 mm langen Gefäßabschnittes hervorgerufen. Dazu wurde links zervikal ein Hautschnitt mit einer Länge von etwa 5 cm durchgeführt. Die *V. jugularis* wurde stumpf frei präpariert und alle abzweigenden Nebengefäße mittels Heamoclips abgeklemmt. Im Abstand von etwa 3 cm wurden Schlingen aus Perma-Handseide vorgelegt, die zum Zeitpunkt „0“ fest zugezogen wurden, um im ligierten Gefäßabschnitt für 180 min eine Blutstase herbeizuführen (Abbildung 11 B). Nach Ablauf der 180 min wurde das Gefäßsegment entnommen, das thrombotische Material entfernt und gewogen (Nassgewicht). Im Versuchsverlauf wurden zu den Zeitpunkten prä-Behandlung, 0, 90 und 180 min nach Applikation außerdem Vollblut und Zitratblut entnommen. Mit dem Vollblut wurde die WBCT (Kap. 3.6.1) gemessen und aus dem Zitratblut wurde Plasma gewonnen zur Bestimmung von aPTT, PT und FXIIa-Aktivität (Kap. 3.6.2 - 5). Des Weiteren wurde die Ohrblutungszeit (Kap. 3.4.1) zu den Zeitpunkten prä-Behandlung, 0 und 180 min nach Applikation bestimmt. Im Anschluss an die Studie wurde in jedem Tier außerdem der Nierenblutungstest durchgeführt (Kap. 3.4.2).

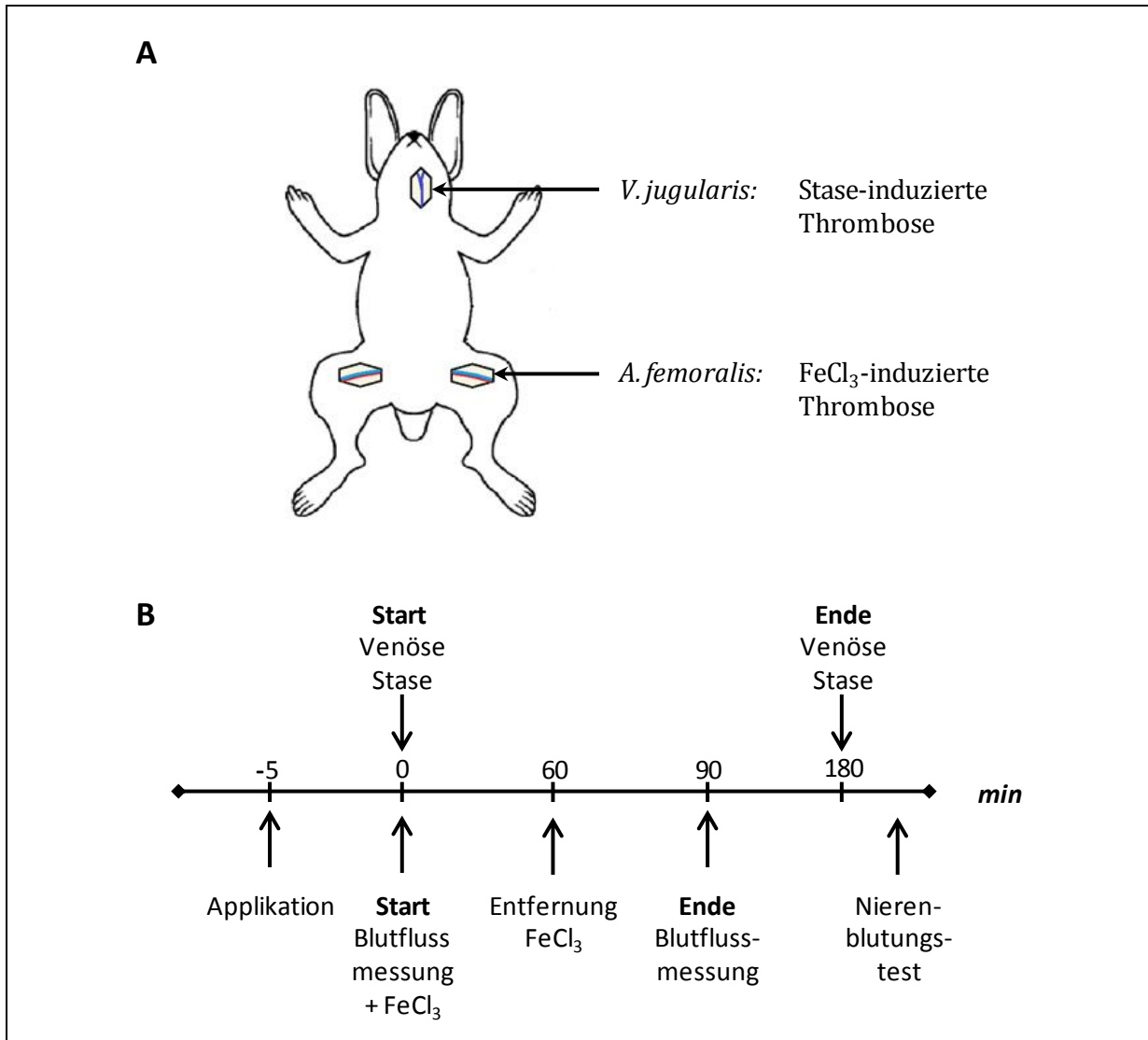


Abbildung 11: Das simultane Thrombosemodell im Kaninchen

A: Simultanes Thrombosemodell, in vivo im Kaninchen. Die V. jugularis der linken Seite wurde freipräpariert. Ein Stück von etwa 30 mm Länge wurde ligiert, um durch eine venöse Stase einen thrombotischen Reiz zu induzieren. Der Thrombus wurde nach 180 min analysiert. Gleichzeitig wurde in beiden freigelegten Aa. femorales für 60 min ein thrombotischer Reiz mittels FeCl₃ (70 %) gesetzt. Distal der Reizung zeichnete eine Ultraschallsonde die Blutflussrate mit der Software von LabChart® auf. Die Pfeile verdeutlichen die Lokalisation der venösen und arteriellen Thrombose. **B:** Studiendesign. Auf einer Zeitschiene kennzeichnen Pfeile den Ablauf der Studie, wobei im oberen Abschnitt das venöse Stase-Modell aufgetragen wurde. Im unteren Teil ist neben der Substanzapplikation und dem Nierenblutungstest das arterielle Thrombosemodell mit Blutflussmessung und FeCl₃-Applikation eingezeichnet. Mithilfe dieses Modells wurde die Wirksamkeit des anti-FXIIa MAb 3F7 im Vergleich zu isotonischer Saline als Positivkontrolle untersucht.

3.3.2 Arteriovenöses Shunt-Modell

Das arteriovenöse (A/V) Shunt-Modell hatte zum Ziel die FXIIa-INH in einem Thrombosemodell auf Basis der Fremdoberflächen-Aktivierung zu überprüfen. Als Versuchstiere wurden weibliche CHB Kaninchen des Lieferanten M. Bauer (Neuenstein, DE) mit einem Gewicht von 3 bis 4 kg verwendet. Jeweils 3 Tiere wurden randomisiert den Versuchsgruppen zugeteilt. Eine Gruppe erhielt anti-FXIIa MAb 3F7 (7mg/kg) und eine zweite Gruppe erhielt isotonische Saline zur Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde einer dritten Gruppe Heparin (300 U/kg) appliziert. Alle Substanzen wurden im gleichen Volumen pro Gewicht eingesetzt.

In diesem Modell wurde, ähnlich zu dem murinen Modell, die Koagulation durch den Kontakt von Blut zu negativ geladenen Fremdoberflächen induziert. Als Fremdoberfläche diente ein Glaselement von ca. 4 cm Länge (Borosilikatglas, Einzelanfertigung; Otto E. Kobe AG, Marburg, DE), das an jedem Ende mit einem Katheter (B Braun Melsungen AG, Melsungen, DE) von 75 mm verbunden wurde. Dieses System leitete den Blutfluss aus der *A. carotis externa* über das Glaselement in die *V. jugularis* (Abbildung 12 A). Vor Versuchsbeginn wurde das Glaselement mit isotonischer Saline vorbefüllt.

Das Kaninchen wurde zunächst narkotisiert und im Halsbereich und auf Höhe der rechten Niere großzügig geschoren. Anschließend wurde die Haut am Hals eröffnet und die *V. jugularis* der linken Seite sowie die *A. carotis externa* der rechten Seite stumpf frei präpariert. Anschließend wurden Fadenschlingen zum Fixieren des Katheters in der Arterie bzw. Vene vorbereitet. Zunächst wurde dann die Arterie kranial mit einem Haemoclip ligiert und etwa 3 cm kaudal transient mit einer Gefäßklemme ligiert. Dann wurde die Arterie mit einem Schnitt der Gefäßschere eröffnet und der Katheter hineingeschoben und darin mittels der vorbereiteten Schlingen fixiert.

Ebenso wurde der Katheter in die venöse Seite eingebracht. Anschließend wurde die Vene kaudal des Katheters in die Ultraschallflusssonde eingehängt, um den Blutvolumenstrom zu detektieren. Das Programm Lab Chart® Pro (ADInstruments, UK) zeichnete mittels Flowmeter TS420 (ADInstruments, UK) den Blutfluss ab dem Zeitpunkt „0“ für 60 min auf. Eine Okklusion wurde als stabil definiert wenn der Blutvolumenstrom für > 2 min bei $\leq 0,0$ mL/min lag. Damit konnte der exakte Zeitpunkt einer thrombotischen Okklusion bestimmt werden. Unmittelbar vor der Substanzapplikation und 60 min nach Applikation wurde die Ohrblutungszeit (Kap. 3.4.1) durchgeführt und Zitratblut entnommen zur Bestimmung der aPTT, PT und FXIIa-Aktivität im Plasma (Kap. 3.6). Als weitere Parameter zur Auswertung wurde außerdem das Nass- und Trockengewicht des aus dem Glaselement entfernten

Thrombus bestimmt. Nach Ablauf der 60 min wurde außerdem der Nierenblutungstest durchgeführt (Kap. 3.4.2). Das Studiendesign wird in Abbildung 12 B gezeigt.

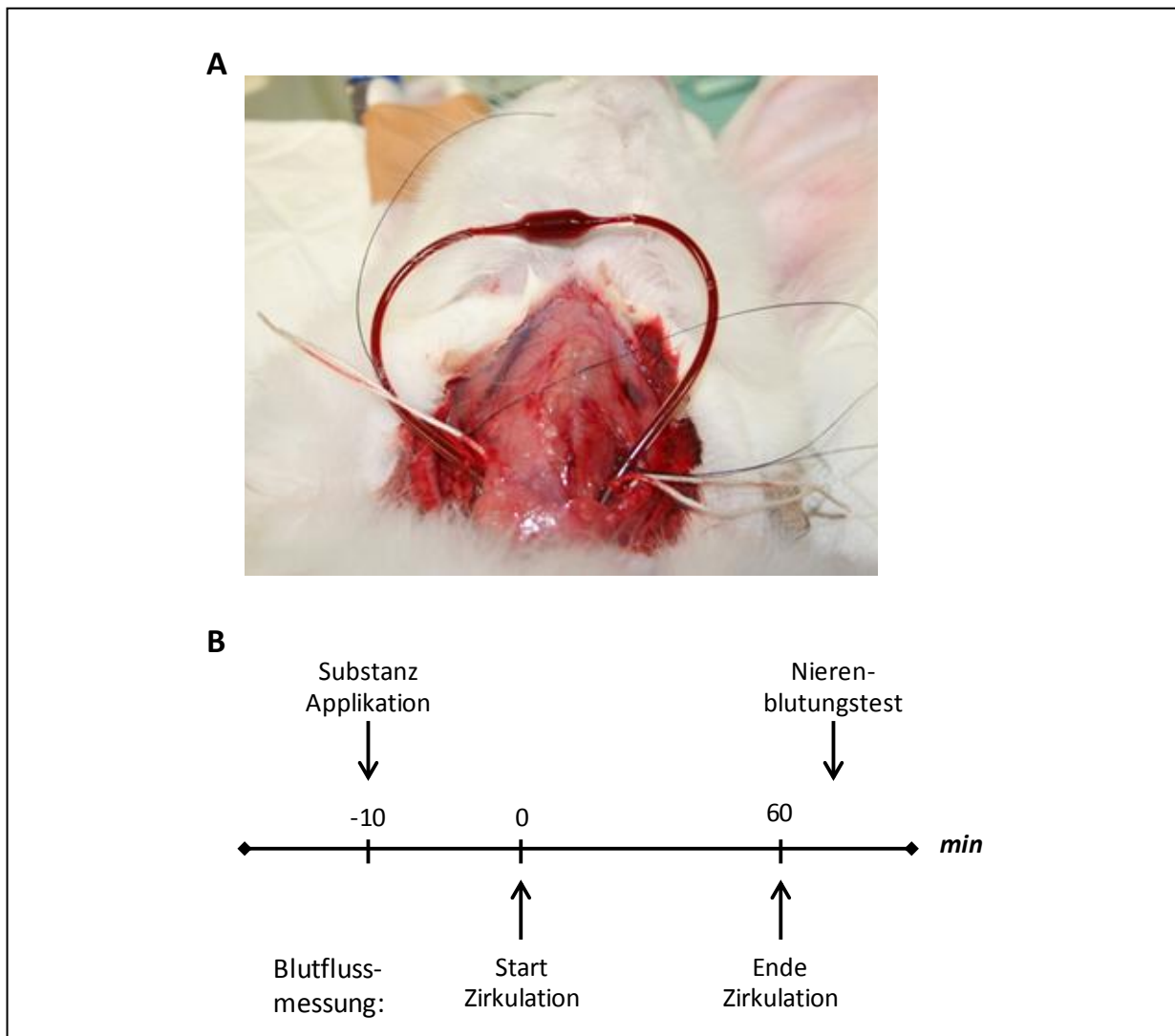


Abbildung 12: Das A/V Shunt-Modell im Kaninchen

A: Der A/V Shunt in situ. Die V. jugularis der rechten Seite, sowie die A. carotis externa der linken Seite wurden frei präpariert. Der Zugang für den A/V Shunt wurde zunächst in der arteriellen Seite geschaffen und anschließend in der venösen. Der A/V Shunt wurde vor der Kanülierung mit Priming-Lösung befüllt. Die Ultraschallsonde wurde an der Vene platziert. Unmittelbar bei Start der Zirkulation durch den A/V Shunt wurde die Blutflussrate für 60 min mit der Software von Lab Chart® aufgezeichnet. Das Glaselement wurde nach 60 min auf thrombotisches Material hin untersucht. **B:** Studiendesign. Auf einer Zeitschiene verdeutlichen Pfeile die wichtigsten Aktionen der Studie. Dabei sind die Substanzapplikation und der Nierenblutungstest oberhalb aufgetragen und die Eckdaten der Blutflussmessung unterhalb der Zeitschiene. In diesem Modell wurde der anti-FXIIa MAb 3F7 auf seine anti-

thrombotische Wirksamkeit untersucht. Als Kontrollsubstanzen wurden isotonische Saline und Heparin im gleichen Volumen pro Gewicht eingesetzt.

3.4 Blutungstests und Clot-Retraktionstest im Kaninchen

3.4.1 Ohrblutungszeit

Um eine potenzielle Blutungsneigung durch die Substanzgabe zu erkennen, wurde die Ohrblutungszeit bestimmt. Dafür wurde mit einer halbautomatisierten Lanzette (Surgicutt®, ITC) ein Schnitt (1 mm Tiefe und 5 mm Breite) in die innere Ohrmuschel gesetzt. Anschließend wurde die Zeit bis zur Hämostase bestimmt, in dem vorsichtig, ohne die Gerinnung zu stören, in 30 sec Intervallen mit einem Filterpapier der Rand der Schnittwunde auf ausgetretenes Blut untersucht wurde. Als Hämostasezeit wurde die Zeit in min notiert, bis das Filterpapier kein Blut mehr aufsog. Die Ohrblutungszeit wurde begleitend und mehrfach während der simultanen arteriellen und venösen Thrombose-Studien und des A/V Shunts in den Versuchstieren durchgeführt. Die maximale Beobachtungszeit wurde auf 20 min nach dem Schnitt festgelegt.

3.4.2 Nierenblutungstest

Der Nierenblutungstest wurde ebenfalls durchgeführt, um eine potenzielle Blutungsneigung durch die Substanzgabe zu untersuchen. Dafür wurde nach Versuchsende die linke Niere des tief narkotisierten Tieres freipräpariert. Mit einem Skalpell wurde ein definierter Schnitt von 5 mm Tiefe und 15 mm Länge gegenüber des Nierenhilus gesetzt. Anschließend wurde die Zeit gemessen, bis durch die Hämostase das Blut zum Stillstand kam, maximal jedoch für 20 min. Dabei wurde makroskopisch die Gerinnung am Wundrand beobachtet. Zur Kontrolle der abgeschlossenen Hämostase wurde mit einem Wattestäbchen vorsichtig unterhalb des Wundrandes etwas geronnenes Blut aufgenommen. Falls die betupfte Stelle trocken blieb, wurde die bis dahin gemessene Zeit als Hämostasezeit notiert. Währenddessen wurde das aus der Wunde ausgetretene Blut unterhalb der Niere mit einer Spritze aufgesaugt und das Blutvolumen bestimmt [Pragst I et al. 2012]. Der Nierenblutungstest wurde im Anschluss an die simultanen Thrombose-Studie und den A/V Shunt in den Versuchstieren durchgeführt.

3.4.3 Clot-Retraktionstest

Bei diesem *in vitro*-Test wurde in Plättchen reichem Plasma (PRP) aus Kaninchenblut die Thrombozytenaggregation mittels Thrombin induziert. Die Analyse beinhaltete die Retraktionszeit des Gerinnsels über 180 min in Doppelbestimmung mit fotografischer Dokumentation, die Gewichtsbestimmung des Serums und des Clots nach 180 min. Dieser Assay diente als Nachweis dafür, dass eine antithrombotische Behandlung mit den FXIIa-INH Testsubstanzen im Modell der simultanen arteriellen und venösen Thrombose die Entwicklung der Clot-Retraktion nicht beeinflusst. Als Grundlage zur Konzentrationsberechnung dient die Dosis der Testsubstanz im Kaninchenplasma nach i.v. Gabe, wobei angenommen wurde, dass ein Kaninchen 33 mL/kg Körpergewicht Plasma besitzt, und die Bioverfügbarkeit der Testsubstanz bei 100 % lag.

Durchführung

Zunächst wurde der *Tyrode's Buffer* mit Glucose und BSA versetzt und im Wasserbad auf 37°C temperiert. Für die fotografische Dokumentation wurde eine passende Beleuchtung arrangiert und die Kamera in Position fixiert. Die Küvetten für den Test wurden zunächst leer gewogen und für 30 min mit *Tyrode's Buffer* inkubiert. Anschließend wurden sie stehend in Fotoposition fixiert.

Dem Versuchstier (CHB Kaninchen) wurde unter Narkose 10,8 mL Vollblut entnommen und sofort mit 1,2 mL Natriumzitrat vermischt. Aus diesem Zitratblut wurde mittels eines Zentrifugationsschrittes bei 160 x g für 15 min und bei RT ohne Bremse PRP hergestellt. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette aufgewirbelt und mit dem weißen Sediment (*Buffy Coat*) abgenommen. Anschließend wurde die Plättchenzahl des PRP in einer 1:2 Verdünnung mit *Tyrode's Buffer* im Scil Vet bestimmt.

Währenddessen wurde das PRP zu je 1 mL aliquotiert und bei 800 x g für 15 min bei RT zu PPP weiterverarbeitet. Mittels der bestimmten Plättchenzahl wurde das PPP-Volumen zur Resuspension des Pellets berechnet. Dabei wurde die Plättchen-Konzentration $0,5 \times 10^6$ Plt/ μ L eingestellt. Jeweils 500 μ L der Plättchen-Suspension wurde in die Küvette eingefüllt und anschließend das erste Foto bei $t=0$ min gemacht. Zur Rekalzifizierung wurden anschließend 10 mM CaCl_2 hinzugegeben. Mit der Zugabe von 3 U/mL Thrombin wurde danach die Aggregation gestartet. Alle Substanzen wurden gründlich und Luftblasen frei mit der Plättchen-Suspension vermischt. Im Anschluss wurde zu den Zeitpunkten $t = 30, 60, 90, 120, 150$ und 180 min jeweils ein Foto gemacht. Nach letztem Foto wurde das Serum mit einer Pipette entfernt und Serumvolumen bestimmt. Außerdem wurde die Küvette mit Clot zur Bestimmung des Nassgewichts gewogen.

Ansatzprotokoll für Tyrode's Buffer ohne Ca²⁺

NaCl	129 mM
NaHCO ₃	8,9 mM
KCl	2,8 mM
KH ₂ PO ₄	0,8 mM
HEPES	10 mM
MgCl ₂	0,8 mM

Anschließend wird der pH auf 7,0 eingestellt. Der Puffer wird bei 4°C gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch werden 0,3% (w/v) BSA und 0,1% (w/v) Glucose hinzugegeben. Alle oben genannten Substanzen wurden von VWR international GmbH, Darmstadt bezogen.

Material, Geräte und Substanzen

Material und Geräte	Firma
Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Limburg a. d. Lahn, DE
Küvetten für Aggregometer APACT	Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen, DE
Nikon Coolpix P7100	Nikon GmbH, Düsseldorf, DE
Substanzen	Firma
Anti-FXIIa MAb 3F7	CSL Limited, Melbourne, AU
BSA	VWR international GmbH, Darmstadt, DE
Calciumchlorid (1M)	VWR international GmbH, Darmstadt, DE
Glucose	VWR international GmbH, Darmstadt, DE
Heparin 2500 U	Ratiopharm GmbH, Ulm, DE
Isotonische Saline	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Natrium-Zitrat (3,13%)	Eifelfango, Bad Neuenahr-Ahrweiler, DE
rHA-Infestin-4	CSL Behring GmbH, Marburg, DE
Thrombin, human	Sigma Aldrich, Steinheim am Albuch, DE

3.5 Das murine Schlaganfallmodell (tMCAO)

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war zu überprüfen, ob die pharmakologische FXIIa-Inhibition einen neuroprotektiven Effekt ausübt. Als Analyseparameter dienten hierbei das totale Infarktvolumen und die neurofunktionellen Defizite. Methodisch wurde das Fadenokklusionsmodell angewandt, das 1996 von Hara et al. beschrieben wurde [Hara H et al. 1996]. Das Modell ist wissenschaftlich anerkannt und simuliert die pathophysiologischen Prozesse nach einem ischämischen Schlaganfall mit Reperfusion nah an der klinischen Realität [Braeuninger S et al. 2012].

Bei dem Schlaganfall-Modell wird ein mit Silikon beschichteter Nylonfaden in die das Gehirn versorgenden Gefäße (*A. carotis*) eingeführt. Durch seine Größe blockiert er den Blutzufluss in die *A. cerebri media* (MCA), was die pathophysiologischen Prozesse einer Ischämie einleitet. Um die Reperfusion zu simulieren, wird der Faden nach einer definierten Zeitspanne (hier 60 min) wieder entfernt. Terminologisch wird das als transiente Okklusion der MCA (*transient middle cerebral artery occlusion*, tMCAO) bezeichnet. Alle Studien im tMCAO-Modell wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Kleinschnitz, Universitätsklinikum Würzburg, Neurologische Klinik und Poliklinik durchgeführt.

Versuchstiere

Für die Schlaganfall-Studien wurden männliche Mäuse vom Stamm C57/Bl6 von der Firma Charles River (Sulzfeld, DE) bezogen. Bei Anlieferungsdatum wogen die Tiere 20 - 25 g und waren 6 - 8 Wochen alt. Die Mäuse wurden bei einer maximalen Gruppengröße von 10 Tieren in einem Polycarbonat-Käfig Typ III gehalten. Die Käfigböden wurden mit entstaubtem Einstreugranulat bedeckt. Die Tiere erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Die Mäuse unterlagen einen Hell-Dunkel-Rhythmus (12 h / 12 h). Die Raumtemperatur betrug 20 - 24 °C bei einer relativen Luftfeuchte zwischen 40 - 50 %.

Narkose

Im tMCAO-Modell wurden die Tiere mit Isofluran (CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf DE) inhalativ betäubt. Dabei wurde die Narkose initial mit 3 - 5 % Isofluran in einer Induktionsbox ohne Abzug eingeleitet, bis die chirurgische Toleranz erreicht war. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde 2 bis 3 % Isofluran (vermischt mit Raumluft) über eine Gesichtsmaske mit Absaugung verabreicht.

Behandlungsansätze

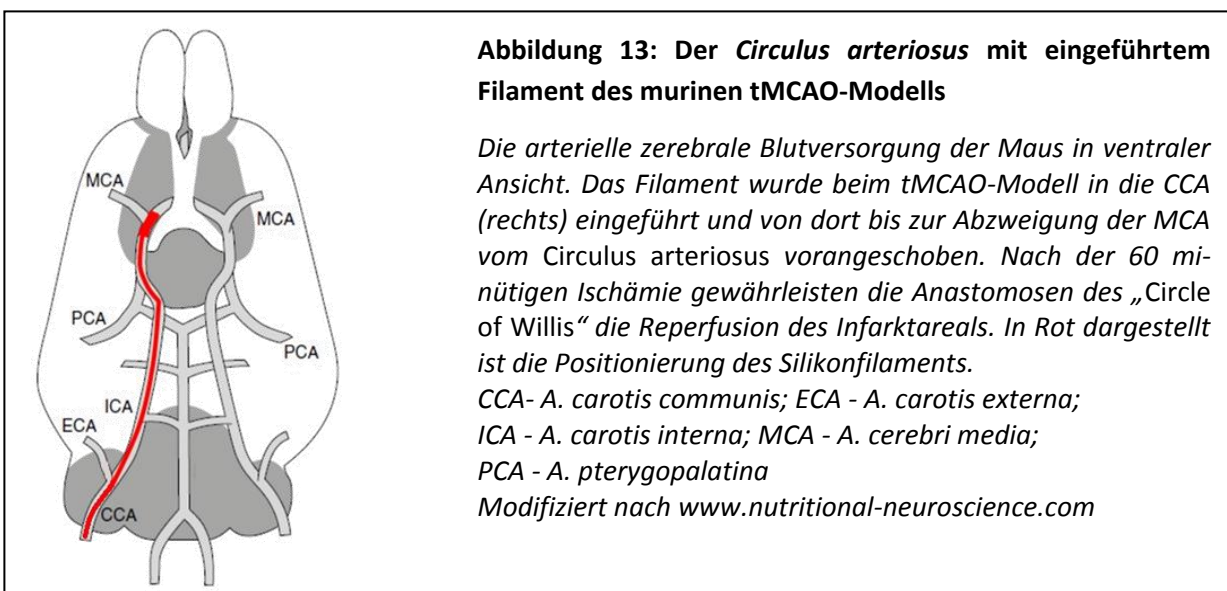
Im prophylaktischen Behandlungsansatz mit anti-FXIIa MAb 3F7 (10, 25 und 50 mg/kg) wurde den Tieren unmittelbar nach initialer Narkose die Testsubstanz bzw. isotonische Saline in gleichen Volumina i.v. appliziert. Der Beginn der MCA-Okklusion erfolgte 10 min darauf. Für die Studie des therapeutischen Behandlungsansatzes mit rHA-Infestin-4 erfolgte die Applikation i.v. und unmittelbar nach Beginn der Reperfusion. In jeder Studie wurden Kontrolltiere und FXIIa-INH-behandelte Tiere randomisiert operiert, sodass an jedem Versuchstag Tiere jeder Gruppe involviert waren. Die Positivkontrollen erhielten isotonische Saline im gleichen Volumen. Zur Negativkontrolle wurden in beiden Behandlungsansätzen jeweils naive (unbehandelte) und Sham-operierte Tiere (vollständige Operation ohne Okklusion) Tiere bei den einzelnen Studien mitgeführt.

3.5.1 Operationstechnik

Die narkotisierte Maus wurde dorsal auf einer Wärmeplatte (37°C) fixiert und an das Tischnarkosegerät angeschlossen. Nach Desinfektion des Operationsfeldes wurde mittels einer zervikalen Mittellinieninzision Zugang zur *Glandula thyreoidea* geschaffen. Die Lappen der *Glandula thyreoidea* wurden stumpf voneinander getrennt, bevor die *A. carotis communis dextra* vom umgebenden Gewebe freigelegt wurde. Mit einer Ligatur (Fadengröße 7,0) wurde das Gefäß verschlossen. Anschließend wurde weiter kranial die *A. carotis externa* freigelegt und mit einem Faden (Größe 7,0) ligiert. Um die *A. carotis interna* wurde ein Knoten vorbereitet (Größe 5,0), der eine Positionsänderung des Silikonfilamentes verhinderte. Mittels eines Gefäßclips wurde die *A. carotis interna* vor der Abzweigung der *A. pterygopalatina* atraumatisch verschlossen. In die *A. carotis interna* wurde mit einer Augenschere ein kleines Loch geschnitten, in das der Silikon-beschichtete Faden bis zum Clip eingeführt wurde. Nachdem der Clip gelöst worden war, konnte der Faden bis zu einem Widerstand vorangeschoben werden, wo er den Abgang der *A. cerebri media* vom *Circulus arteriosus cerebri* blockierte (Abbildung 13). Das Silikonfilament wurde durch den vorbereiteten Knoten fixiert und für 60 min im Gefäß belassen. Zur Überprüfung der richtigen Position konnte mit einem Lineal das herausstehende Ende des Fadens von der Bifurkation der *A. pterygopalatina* von der *A. carotis interna* gemessen werden. Die Länge des Fadenendes sollte maximal 11 mm betragen. Anschließend wurde die Wunde verschlossen. Das Tier konnte in einem beheizten Käfig aus der Narkose erwachen.

Kurz vor Ablauf der Ischämie-Phase von 60 min wurde das Tier erneut narkotisiert und zur Reperfusion der Faden entfernt. Anschließend wurde das Gefäß mit Hilfe des Fixierknotens ligiert. Da die zerebrale Blutversorgung über Anastomosen des *Circulus arteriosus* quervernetzt ist, erfolgt die Reperfusion des ischämischen Bereiches durch die Blutversorgung der contralateralen ACC.

Die Wunde wurde mit einer Naht verschlossen und lokal mit Lidocain betäubt. In einem beheizten Käfig konnte die Maus aus der Narkose erwachen. Nach einer Reperfusionsperiode von 23 h (entspricht 24 h nach der Operation) wurden die Tiere auf ihre neuromotorischen Funktionen getestet (Kap. 3.5.2).



Ausschlusskriterien

Um zu gewährleisten, dass die Ischämie in allen Gruppen vergleichbar war, wurde unmittelbar nach Ziehen des Fadens die erfolgreiche Reperfusion bewertet. Dafür wurde beobachtet, ob Blut aus der arteriellen Öffnung austrat. War das nicht der Fall, wurde das Tier ausgeschlossen, da vermutlich durch ein zu schnelles Entfernen des Fadens das Gefäß kollabiert und somit die erfolgreiche Reperfusion nicht sichergestellt war. Ein weiteres Ausschlusskriterium 24 h nach der Operation war die Kombination aus vollständigem Fehlen neurofunktioneller Defizite in Abwesenheit eines Infarktkerns nach der Vitalfärbung mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC).

Material, Geräte und Substanzen für das experimentelle murine Schlaganfallmodell

Material und Geräte	Firma
Einmalspritze 1 mL	B. Braun Melsungen AG, DE
Nylon-Monofilament (Art.:60-1720RE)	Doccol, Albuquerque, NM, USA
Perma-Handseide, Ethicon	Johnson & Johnson Medical GmbH
Operationsbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DE
Wattestäbchen	Hartenstein, Würzburg , DE
Tischnarkosegerät UniVet Porta	Groppler, Deggendorf, DE
Isotonische Saline	B. Braun Melsungen AG, DE
Mikroskop	Zeiss, Jena, DE

Substanzen	Firma
Anti-FXIIa MAb 3F7	CSL Limited, Melbourne, Australien
Bepanthen Augen-und Nasensalbe	Bayer Healthcare GmbH, Leverkusen, DE
Isotonische Saline	B Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Natriumzitat	EifelFango, Bad Neuenahr-Ahrweiler, DE
rHA-Infestin-4	CSL Behring GmbH, Marburg, DE
PBS (10x)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE

3.5.2 Neurofunktionelle Verhaltensuntersuchungen

24 h nach Induzierung des experimentellen Schlaganfalles wurde die Mortalität der einzelnen Versuchsgruppen ausgewertet. Anschließend wurden die Tests zur Feststellung neurologischer Defizite durchgeführt. Die Mäuse erhielten vor der Operation kein Training in den Verhaltenstests.

Neuroscore

Die überlebenden Versuchstiere wurden zunächst mit dem modifizierten Bederson Score (Neuroscore) auf ihre spontane motorische Funktion beurteilt [Bederson JB et al. 1986]. Jede Maus wurde beim Herausheben aus dem Käfig begutachtet und ihr Verhalten auf einer ebenen Fläche für die Dauer einer Minute beobachtet. Das Verhalten wurde in die folgenden Kategorieneingeteilt, wobei „0“ für kein Defizit vergeben wurde, und „5“ die schlechteste Wertung darstellte:

Beurteilungskategorien nach dem modifizierten Bederson Score

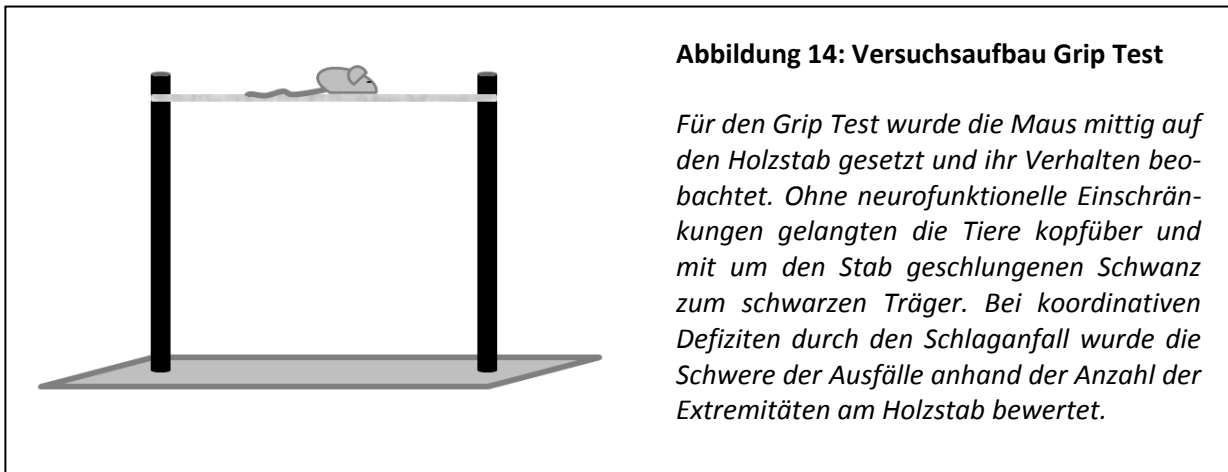
0	Kein neurologisches Defizit
1	Fehlende Extension der Vordergliedmaße
2	Reduzierter Muskeltonus
3	Im Kreis laufend
4	Drehung um die longitudinale Körperachse („Spinning“)
5	Keine Spontanbewegung zu beobachten

Grip Test

Nach der Beurteilung des Bederson Scores wurden die Versuchsgruppen auf ihre koordinatorischen Defizite untersucht. Hierfür wurde die Maus mittig auf eine Apparatur mit einem runden Holzstab (Durchmesser ca. 5 mm, Länge 40 cm) gesetzt, der zwischen zwei stabilen Trägern montiert war. Der Holzstab befand sich auf einer Höhe von 30 cm, sodass das Versuchstier den Boden optisch nicht erfassen konnte. Unter normalen Umständen klammert sich eine Maus kopfüber mit allen 4 Pfoten an den Holzstab und wickelt den Schwanz spiralförmig darum. Auf diese Weise schaffen es die meisten Tiere bis zum Träger zu klettern, um dort eine sitzende Position einzunehmen oder über den Träger zu auf den Boden zu gelangen [Moran PM et al. 1995]. Bei Defiziten in der motorischen Koordination, wie es beim experimentellen Schlaganfallmodell der Fall ist, zeigen sich Einschränkungen der Kletterfähigkeit und der Kraft. Der Grip Test ergänzt den globalen Bederson Score mit der Evaluation der motorischen und koordinativen Kapazitäten nach tMCAO. In Bezug steht dazu das Infarktvolumen [Austinat M et al. 2009; Kleinschnitz C et al. 2006; Kraft P et al. 2010].

Beurteilungskategorien nach dem Grip Test

0	Maus fällt herunter, ohne den Versuch sich oben zu halten
1	Festklammern mit mindestens einer Extremität (Beine, Schwanz)
2	Festklammern mit mindestens zwei Extremitäten
3	Festklammern mit mindestens drei Extremitäten
4	Festklammern mit vier bis fünf Extremitäten
5	Kein Defizit: Maus entkommt auf den Träger



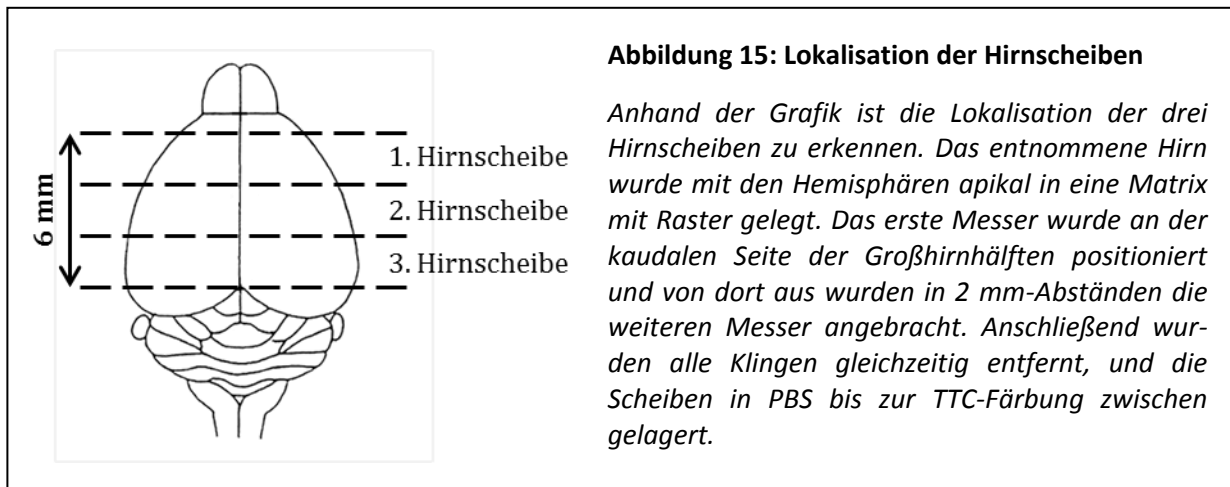
Im Anschluss an die beschriebenen Tests wurden die Tiere tief narkotisiert und final entblutet. Aus 0,5 mL Zitratblut (10%) wurde das Plasma gewonnen. Unmittelbar im Anschluss wurde das Hirn entnommen und nach den Anleitungen im folgenden Kapitel weiter bearbeitet.

3.5.3 Histochemische Infarktvolumenbestimmung

Die Vitalfärbung mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung (TTC) ist ein gängiger Test zur Identifizierung von ischämischem Gewebe im tMCAO-Modell [Liu F et al. 2009]. Der Indikator TTC wird dabei von den vitalen Zellen aufgenommen und in einer Redox-Reaktion in den Mitochondrien zu 1,3,5-Triphenylformazan umgewandelt. 1,3,5-Triphenylformazan besitzt ein Extinktionsmaximum bei 492 nm und erscheint daher als rote Färbung. Dem entsprechend färben sich die vitalen Areale rot, während die nekrotischen Areale ungefärbt bleiben.

Den Mäusen der Studien wurde 24 h nach Beginn der Reperfusion und damit im Anschluss an die Verhaltenstests final Blut entnommen. Durch eine zervikale Dislokation wurde der Tod sichergestellt. Anschließend wurde das Hirn entnommen und in einer Matrix positioniert. Von kaudal wurden 2 mm dicke Scheiben geschnitten, die in PBS (4 °C) aufgefangen wurden (Abbildung 14). Anschließend wurden alle drei Scheiben gemeinsam für 10 min bei RT in die vorbereitete TTC-Färbelösung gelegt. Danach wurden die Schnitte mit der rostralen Seite unten auf einem Scanner platziert und eingescannt. Anschließend wurden die Bilder anhand der Software Image J ausgewertet. Mit Hilfe von Excel wurde das totale Infarktvolumen aus den Rohdaten der drei Hirnscheiben berechnet.

Die Hirnscheiben konnten anschließend noch weiter verarbeitet werden, dafür wurde allerdings bei der Hirn-Entnahme und Färbung sehr sauber und schnell gearbeitet.



Berechnung des totalen Infarktolumens:

Hierfür wurden die ischämischen (ungefärbten) Bereiche des Gewebes umfahren und ihre Fläche bestimmt und nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Volumen}_{\text{Infarkt}} = (A_1 + A_2 + A_3) \cdot 100 \cdot L$$

A_{1-3} bezeichnen die Fläche der einzelnen Hirnschnitte, die durch Image J in der Einheit cm^2 ausgegeben werden. Daher muss mit dem Faktor 100 multipliziert werden, um die Fläche in mm^2 zu berechnen. Zur Berechnung des dreidimensionalen Infarktolumens wird außerdem die Dicke der Schnitte (L) multipliziert. Sie beträgt 2,0 mm für jeden Schnitt. Für die statistische Analyse wurden die erhaltenen Datensätze in die Software Graph Pad Prism (Statcon, Witzenhausen, DE) eingepflegt.

Material, Substanzen und Geräte zur TTC-Färbung

Material	Firma
Klingen mit Griffschutz	Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, DE
12-well Platte	Nunc GmbH und Co.KG, Wiesbaden, DE
Pinzette	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DE
Löffelspatel	Hartenstein Laborbedarf, Würzburg, DE
Operationsbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, DE
Hirnmatrix, koronal (Maus)	World Precision Instruments, UK

Substanzen	Firma
Isotonische Saline	B Braun Melsungen AG, Melsungen DE
Natriumzitat, 3,13 %	EifelFango, Bad Neuenahr-Ahrweiler, DE
PBS (10x), steril	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, DE
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE

3.5.4 Fibrin(-ogen)-Bestimmung mittels Western Blot

Fibrin wird im Rahmen thrombotischer Prozesse aus seiner Vorstufe Fibrinogen gebildet und lagert sich im Gewebe ab [Okada Y et al. 1994]. Mittels eines kreuzreaktiven Antikörpers gegen Fibrinogen sollte anhand der relative Fibrin(-ogen)-Dichte das Ausmaß der Ischämie-induzierten Mikrothrombosen evaluiert werden. Hierfür wurde die zweite Hirnscheibe (Abbildung 15) mit einem Skalpell sektioniert, wie in Abbildung 16 dargestellt. Dafür wurde die Scheibe zunächst mittig in ipsilateral und contralateral der Ischämie getrennt. Anschließend wurden die Hälften in Basalganglien (BG) und Cortex (CX) unterteilt. Das Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

Probenaufbereitung für den Western Blot

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut. Zu dem Gewebe wurden 100 µL RIPA-Puffer in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde das Gewebe mit einem Mikropistill gleichmäßig zerrieben und zusätzlich 3 mal für 10 sec mit Ultraschallpulsen homogenisiert. Die Proben wurden für 30 min bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Gefäß überführt und das Pellet verworfen.

Ansatzprotokoll RIPA-Puffer 0,1% SDS

1,25 ml 1 M Tris (pH 7,4)	= 25 mM
1,5 mL 5 M NaCl	= 150 mM
0,5 mL 100% NP-40	= 1%
0,5 mL 10% SDS	= 0,1%
ad 50 mL Aqua dest.	

In dieser Lösung wird 1 Tablette Proteinase-Inhibitor aufgelöst. Aliquots wurden bei Bedarf aufgetaut und frisch zur Gewebeprobe gegeben.



Bicinchoninsäuren-Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mittels Bicinchoninsäuren (BCA)-Test durchgeführt. Für 24 Proben wurde 25 mL Bicinchoninsäuren-Lösung mit 0,5 mL Kupfer(II)Sulfat-Lösung gemischt. Anschließend wurde je 1 mL der BCA-Testlösung in ein Reaktionsgefäß je Probe vorgelegt. Von der Probe wurden jeweils 2 µL hinzu pipettiert und mit der Lösung vermischt. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C. Gleichzeitig mit den Proben wurden Proteinstandards zur Kalibrierung des Photometers auf die gleiche Weise vorbereitet. Nach der Inkubationszeit wurden die Standards und Proben in Einmal-Küvetten umgefüllt und unverzüglich gemessen. Dabei wurde beim Photometer der Dilutionsfaktor eingestellt, sodass die Konzentrationsberechnung automatisiert erfolgte.

Acrylamid-Gelelektrophorese

I) Herstellung der SDS-Gele (12 %)

Zwei Glasplatten wurden mit Isopropylalkohol gesäubert und in die Gießapparatur eingespannt. Anschließend wurde das Gemisch für zwei Trenngele (12 % SDS, reduzierend) hergestellt. Dabei wurde TEMED zuletzt hinzugefügt. Nach zügigem Mischen wurde das Trenngel-Gemisch in den Hohlraum zwischen die Glasplatten gegossen und mit 1 mL Isopropylalkohol beschichtet. Das Trenngel benötigte eine Aushärtungsdauer von mindestens 30 min. Danach wurde der Isopropylalkohol entfernt und die Mischung für das Sammelgel (5 % SDS) hergestellt. Das Sammelgel wurde bis zum oberen Rand der Glasplatten gefüllt und zügig und Luftblasen frei ein Gelkamm mit 15 Laufspuren eingesteckt. Auch das Sammelgel benötigte 30 min zum Polymerisieren.

II) Ansatzprotokoll für SDS-Gele

2 Trenngele (12 %):

Aqua dest.	3,3	mL
30 % Acryl/Bisacryl.	4,0	mL
1,5 M Tris pH 8,8	2,5	mL
10 % SDS	0,1	mL
10 % APS	0,1	mL
TEMED	0,004	mL

2 Sammelgele (5 %):

Aqua dest.	2,7	mL
30 % Acryl/Bisacryl.	0,67	mL
1, M Tris pH 6,8	0,5	mL
10 % SDS	0,04	mL
10 % APS	0,04	mL
TEMED	0,004	mL

III) Vorbereitung der Proteinproben

Um den Fibrin(-ogen)-Gehalt pro Proteingehalt bestimmen zu können, wurden die Proteinproben auf eine Konzentration von 10 µg Gesamtprotein pro 20 µL Auftragsansatz gebracht. Dafür wurde das entsprechende Volumen aus der Probe entnommen und mit Aqua dest. auf 10 µL aufgefüllt. Anschließend wurden zu jedem Ansatz 10 µL SDS-Probenpuffer (2x) dazu pipettiert und dieses Gemisch 5 - 10 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Danach wurden jeweils 10 µL des Ansatzes in eine Gel-tasche aufgetragen.

IV) Ansatzprotokoll der Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese

10x Laufpuffer

SDS	10	g
Tris	30,3	g
Glycin	144,1	g
ad 1 Liter mit Aqua dest.		

4x SDS Probenpuffer (reduzierend):

62, 5 mM Tris (1 M, pH 6,8)	6,25	mL
8 % SDS	8	g
15 % Glycerin	15	mL
3 % β-Mercaptoethanol	3	mL
Spatelspitze Bromphenolblau	3,6	mg
Aqua dest.	75,75	mL

1x Laufpuffer: 100 mL 10x Laufpuffer + 900 mL Aqua dest.

V) SDS-Gelelektrophorese

Es wurden immer 2 Gele in die Apparatur eingespannt und auf Dichtigkeit der Einspannung überprüft. Danach wurde die Kammer mit 1x Laufpuffer gefüllt und die Geltaschen mit dem Protein-Standard Marker sowie den Auftragsansätze beladen. Die Gelkammer wurde mit dem Power-Supply (BioRad) verbunden. Die Gele wurden für 75 min bei 20 mA pro Gel gefahren.

Proteintransfer (Semi-Dry-Blotting)

Nach dem die Proteine durch die Gelelektrophorese nach Größe getrennt worden waren, wurden die Gele aus den Glasplatten entfernt und in Blottingpuffer (1x) mit frisch zugefügtem Methanol (200 µL) geschwenkt. Je Gel wurde eine PVDF-Membran kurz in Methanol befeuchtet und danach in Blottingpuffer (1x) eingeweicht. Ebenso wurden pro Gel 6 Lagen Whatman®-Blottingpapier in Blottingpuffer (1x) durchfeuchtet.

Das „Sandwich“ zum Proteintransfer wurde folgendermaßen von der Bodenplatte aus aufgebaut:

3 Blätter Blotting-Papier, PVDF-Membran, Gel, 3 Blätter Blotting-Papier. Jede Lage wurde sorgfältig und Luftblasen frei aufgetragen. Der Proteintransfer mittels Power-Supply wurde bei 100 mA pro Gel für 90 min durchgeführt. Dabei wurde die elektrische Spannung auf 25 V limitiert.

Ansatzprotokoll des Blottingpuffers

<i>10x Blottingpuffer</i>			<i>1x Blottingpuffer</i>		
Glycin	144	g	10x Blottingpuffer	100	mL
Tris	30,3	g	Methanol	200	mL (frisch dazugeben)
+ ad 1 Liter mit Aqua dest.			Aqua dest.	700	mL

Entwicklung des Blots

I) Antikörperbindung

Die feuchte Membran wurde kurz in Waschpuffer (1x) eingelegt. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen in Blockpuffer für 30 min bei RT geblockt. Die Membran wurde dabei automatisiert geschwenkt. Währenddessen wurde der primäre Antikörper in der gewünschten Verdünnung in Blockpuffer angesetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Membran aus dem Blockpuffer entnommen und mit 2 mL der Antikörper-Verdünnung eingeschweißt. Über Nacht wurde der Blot bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Zur Entfernung des ungebundenen Antikörpers wurde der Blot am

nächsten Tag viermal in 30 min mit Waschpuffer unter Schwenken gewaschen. Im Anschluss wurde der sekundäre Antikörper in einer Dilution von 1:5000 für 60 min bei RT auf dem Blot inkubiert. Überschüssige Substanz wurde wieder in 4 Waschschritten in insgesamt 30 min unter Schwenken entfernt.

II) Entwicklung mit Elektrochemilumineszenz

Die Elektrochemilumineszenz (ECL)-Lösung wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Der Waschpuffer wurde vollständig von den Blots entfernt, ohne dass die Membran austrocknete. Die ECL-Lösung wurde 5 min auf dem Blot inkubiert. Anschließend wurde die Membran in eine Röntgenkassette eingelegt. In einer Dunkelkammer wurde der Röntgenfilm passgenau auf die Membran zur Belichtung gelegt. Für Fibrin(-ogen)-Blots betrug die Belichtungszeit 10 sec, und für β -Actin-Blots 5 sec. Der Röntgenfilm wurde automatisiert entwickelt. Nach der Filmentwicklung wurden die Membranen getrocknet und die Filme digitalisiert.

III) Ansatzprotokoll der Lösungen zur Entwicklung des Blots

10x Waschpuffer:	10x PBS + 0,5 % Tween
1x Waschpuffer:	1x PBS + 0,05 % Tween
Blockpuffer:	5% Milchpulver in Waschpuffer gelöst

IV) Unvollständiges Strippen des Blots

Zur Kontrolle der richtigen Gel-Beladung wurden mittels H_2O_2 die Bindestellen der ECL-Moleküle oxidiert. Obwohl also der ursprüngliche primäre Antikörper (anti-Fibrinogen) gebunden bleibt, kann ein zweiter Primärantikörper (anti- β -Actin) hinzugefügt werden. Dieses Vorgehen hat sich für Blots etabliert, bei denen einerseits beide Primärantikörper aus verschiedenen Spezies stammen und andererseits die zu analysierenden Banden auf dem Gel deutlich in unterschiedlicher Höhe laufen.

Zum Entfernen des ersten Primärantikörpers („Strippen“) wurde eine Lösung aus H_2O_2 (15 %) in Waschpuffer hergestellt. Darin wurde die noch feuchte Membran im Anschluss an die Filmentwicklung für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten 4 Waschschrritte in insgesamt 30 min auf dem Schüttler bei RT. Im Anschluss wurde die Membran erneut geblockt, bevor sie mit einem weiteren Primärantikörper gegen das Referenzprotein β -Actin inkubiert wurde.

Analysemethode nach Luke Miller

Wie auch die TTC-Volumetrie wurde die relative Proteinexpression von Fibrin(-ogen) über die Methode nach Luke Miller im Programm Image J evaluiert. Ein genaues Protokoll ist hier zu finden:

http://www.lukemiller.org/ImageJ_gel_analysis.pdf

Prinzipiell wurde anhand der optischen Dichte und der Ausdehnung der Banden eine relative Fläche ermittelt, die mithilfe von Microsoft Excel weiter analysiert wurde. Für jeden Blot wurde zunächst die relative Dichte von Fibrin(-ogen) bestimmt. Nach Strippen der Membran erfolgte die Färbung mit dem Referenzprotein β -Actin. Die Rohdaten wurden in Excel ins Verhältnis zueinander gesetzt, wobei die Proteindichte von Fibrin(-ogen) durch β -Actin dividiert wurde:

$$\text{Proteindichte(relativ)} = \frac{\text{Proteindichte (Fibrin(-ogen))}}{\text{Proteindichte } (\beta - \text{Actin})}$$

Die statistische Analyse der Rohdaten wurde im Programm GraphPad Prism durchgeführt.

Material, Substanzen und Geräte für die Fibrin(-ogen)-Bestimmung

Material, Substanzen und Geräte	Firma
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Bicinchoninsäure	Sigma Aldrich, München, DE
Blotkammer	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, DE
Complete Protease Inhibitor Tabletten	Roche Applied Science, Mannheim, DE
ECL-Plus	GE Healthcare, Freiburg, DE
Gelkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
HERAEUS® LABOFUGE 400	Thermo Scientific GmbH, Schwerte, DE
Kupfer(II)Sulfat-Lösung	Sigma Aldrich, München, DE
Medical X-Ray Typ Fujifilm Super RX (18 x 24cm)	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, DE
Mikropistill für 1,5 mL Reaktionsgefäße	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, DE
NanoPhotometer™ Pearl	Implen GmbH, München, DE
NonidetTMP40 Substitute	Sigma Aldrich, München, DE

Precision Plus Protein Dual standards (Marker)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
PVDF-Membran, 0,45 µm	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, DE
Rotiphorese®Gel 30 (Acrylamid)	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe, DE
Wippschüttler	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg, DE
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	Sigma Aldrich, München, DE
Tris (hydroxymethyl) aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt, DE
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Antikörper	Firma	Dilution
Anti-Fibrinogen (Kaninchen)	Acris Antibodies, Herford, DE	1:500
Anti-β-Actin (Maus)	Sigma-Aldrich, München, DE	1:10.000
Anti-Kaninchen (Esel) mit HRPO	Dianova GmbH, Hamburg, DE	1:5000
Anti-Maus (Esel) mit HRPO	Dianova GmbH, Hamburg, DE	1:5000

3.5.5 mRNA-Expressions-Bestimmung über die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

Die vorderste Hirnscheibe wurde nach der TTC-Färbung sofort zur in RNAlater® stabilisiert, um die RNA-Degradation zu verhindern. Anschließend wurde das Hirn mit einem Skalpell in die ischämische und kontralaterale Hemisphäre getrennt und weiter aufgeteilt in CX und BG (Abbildung 16). Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

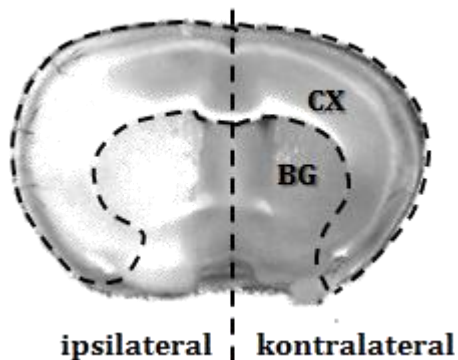


Abbildung 17: Sektionierung der Hirnscheiben für die quantitative mRNA-Bestimmung

Gewebeaufteilung zur mRNA-Bestimmung der ersten Hirnscheibe. Zunächst wurde mit einem Skalpell ein mittiger Schnitt zur Trennung der ipsilateralen (ischämischen) Hirnhälfte und der kontralateralen Seite durchgeführt. Anschließend wurden diese beiden Hälften unterteilt in Cortex und Basalganglien, wobei die Fasern der Capsula externa als Orientierung dienten. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die Schnittkanten. BG - Basalganglien; CX - Cortex

Primer zur mRNA-Expressionsanalyse

Die Zytokine TNF- α und IL-1 gehören zu den schon in geringen Mengen sehr potenten Mediatoren einer inflammatorischen Reaktion. Ihre mRNA ist auch unter physiologischen Bedingungen im Hirngewebe von Menschen und Nagern in geringen Mengen nachweisbar [BrederCD et al. 1993; Clausen BH et al. 2005; Lambertsen KL et al. 2005; Vitkovic L et al. 2000]. Die Änderung der Expression dieser pro-inflammatorischen Mediatoren unter Ischämie/Reperfusion wurde mehrfach beobachtet und wird im Folgenden mit Referenzen belegt. Als Vertreter der anti-inflammatorischen Biomarker wurde TGF- β ausgewählt. Der Biomarker Endothelin-1 wurde zur Evaluierung der BHS-Integrität nach dem ischämischen Schlaganfall herangezogen.

IL-1 β

Der Entzündungsmediator IL-1 β wird durch stimulierte Monozyten synthetisiert und kurz darauf sezerniert. Schon wenige Nanogramm des hochwirksamen Zytokins induzieren die native Immunantwort mit Anstieg von neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten, akute Phase Proteine und dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-6. Unter physiologischen Bedingungen ist das Zytokin weder im Blutplasma noch im Knochenmark nachweisbar. Im Zuge neuroinflammatorischer Prozesse, beispielsweise nach ischämischer Hirnschädigung, spielt IL-1 eine Schlüsselrolle zur Pathogenese [Denes A et al. 2011; Dinarello CA 2011]. Die Quelle der IL-1 β Ausschüttung nach experimentellen Hirnschäden ist die Mikroglia des ZNS [Davies CA et al. 1999; Hanisch UK 2002]. Als lokale Komponente des Immunsystems übernimmt sie die native Immun-Abwehrfunktion im ZNS. Vier Stunden nach einer Ischämie konnte durch Luheshi et al. daher eine mikrogliale Expression des Zytokins IL-1 demonstriert werden [Luheshi NM et al. 2011]. Diese frühe Form wurde als IL-1 α charakterisiert. Das legt die Vermutung nahe, dass die für die Vermittlung neurodegenerativer Prozesse verantwortliche Form IL-1 β [Rothwell PM 2001; Touzani O et al. 1999] in der initialen Reperfusionsphase aus dem peripheren Blutkreislauf entstammt und nicht aus der ortsansässigen Mikroglia [Lambertsen KL et al. 2012]. Da im experimentellen Schlaganfallmodell eine Korrelation zwischen den klinischen Symptomen mit dem Ausmaß der IL-1 β -Expression auf mRNA-Ebene hergestellt werden konnte, wurde dieses Zytokin als Biomarker für die vorliegende Arbeit verwendet [Austinat M et al. 2009].

TNF- α

Die pleiotrope Wirkung von TNF- α (Tumornekrose-Faktor; TNF) wird hauptsächlich über die Rezeptoren p55 und p57 vermittelt, die jeweils verschiedene biologische Effekte hervorrufen. Das Expressi-

onsprofil des Zytokins in der Frühphase nach Ischämie/Reperfusion wurde im Nagermodell intensiv erforscht. Im murinen tMCAO-Modell konnte die Gruppe um Ohtaki 2004 einen massiven Anstieg von TNF- α in der Zeit zwischen 12 bis 24 h nach einer Ischämie nachweisen [Hill GR et al. 1999; Ohtaki H et al. 2004].

Das Zytokin wird nach einer Ischämie hauptsächlich durch die ortsansässigen Mikroglia exprimiert [Dziewulska D et al. 2003]. Es wurde gezeigt, dass die massive Hochregulation von TNF- α den Ischämie-induzierten neuronalen Zelluntergang im ZNS vorantreibt [Botchkina GI et al. 1997]. Bei den pathophysiologischen Prozessen vermuteten Yin et al. eine direkte Beteiligung durch TNF- α [Yin L et al. 2003]. Jedoch werden auch neuroprotektive Eigenschaften durch die Hochregulation dieses Zytokins diskutiert [Bruce AJ et al. 1996; Gary DS et al. 1998; Lambertsen KL et al. 2009].

TGF- β

Der Transformierende Wachstumsfaktor (TGF) gehört ebenfalls zur Klasse der Zytokine. Es existieren 3 Isoformen des Faktors: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3. Hauptsächlich die Form TGF- β 1 wird im Zuge von akuten und chronischen ZNS-Erkrankungen vermehrt exprimiert. Dazu gehören Multiple Sklerose, Trauma, Alzheimer und der Schlaganfall [Finch CE et al. 1993]. Abhängig vom aktivierten Rezeptor wirkt TGF- β 1 auf die Zellproliferation, -differenzierung und Angiogenese, kann aber auch die Apoptose unterstützen. Im ZNS kommen TGF- β Rezeptoren ubiquitär vor. Daher konnten für TGF- β im Schlaganfallmodell sowohl neuroprotektive Effekte als auch eine gliale Fibrose beobachtet werden [Buckwalter MS et al. 2004; Buisson A et al. 2003; Moon LD et al. 2001]. Die unmittelbare Beteiligung von TGF- β nach einer ischämischen Periode ist über die erhöhten mRNA-Spiegel im Plasma von Ratten über mehrere Wochen gezeigt worden [Yamashita K et al. 1999]. Die starken neuroprotektiven Effekte werden vermutlich über Oligodendrozyten vermittelt. Weiterhin wird vermutet, dass TGF- β einen immunomodulatorischen Effekt auf aktivierte Mikroglia und Makrophagen ausübt, sodass nicht-funktionales Narbengewebe (Astrogliose) gebildet wird [Doyle LM et al. 1995].

Edn-1

Das Peptid Endothelin-1 wird durch das zerebrale Gefäßendothel synthetisiert [Rubanyi GM et al. 1994]. Unter physiologischen Bedingungen wirkt es regulierend auf den zerebralen Blutfluss. Eine Erhöhung des Edn-1 Plasmaspiegels wurde sowohl in Patienten nach ischämischem Schlaganfall, als auch in Tiermodellen demonstriert [Barone FC et al. 1994; Bian LG et al. 1994; Ziv I et al. 1992].

Abhängig vom aktivierten Rezeptortyp bewirkt Edn-1 vasokonstriktiv (ET_A) oder vasodilatatorisch (ET_B). Unter ischämischen Bedingungen konnte ET_A-vermittelt ein Pathologie aggravierender Effekt beobachtet werden, da seine Aktivierung den oxydativen Stress (ROS-Produktion) verstärkt und eine Wasserakkumulation (Ödembildung) triggert. Dies trägt zur Disruption der BHS unter ischämischen Bedingungen im tMCAO-Modell bei [Leung JW et al. 2009].

Durchführung der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR)

I) Extraktion der RNA

Zunächst wurde das Gewebe in 2 mL-Reaktionsgefäßen auf Eis aufgetaut. Durch die Zugabe von 700 µL Trizol® wurden die RNasen der Probe inhibiert und die RNA-Integrität während der Homogenisierung des Gewebes geschützt. Der Zellaufschluss wurde mit dem Micra Power Homogenisator (30.000 min⁻¹) durchgeführt, bis das Homogenisat gleichmäßig trübe war. Es folgte eine Inkubationszeit von 5 min, wonach die Proben mit 200 µL Chloroform versetzt wurden. Der Ansatz wurde gründlich gemischt (Vortex) und 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 15 min bei 4 °C und 16.000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase der Probe wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µL Isopropylalkohol gründlich vermischt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4 °C und 16.000 x g, nachdem die RNA als Pellet am Gefäßboden sichtbar wurde. Der Überstand wurde abgenommen und 1 mL Ethanol (75 %) auf das Pellet gegeben. Die Probe wurde gründlich gemischt (Vortex) und anschließend erneut zentrifugiert (15 min bei 4 °C und 16.000 x g). Anschließend wurde der Überstand erneut abgenommen, und das Pellet über Nacht (10 h) geschützt unter dem Abzug getrocknet. Im nächsten Arbeitsschritt wurde das Pellet in 33 µL Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser (DEPC-H₂O) gelöst. DEPC inaktiviert RNasen, sodass die Qualität der extrahierten RNA erhalten bleibt [Summers WC 1970]. Zur besseren Lösung wurden die Proben für 10 min in einem Heizblock bei 55 °C inkubiert und zwischendurch dreimalig durchmischt (Vortex). Die Bestimmung des RNA-Gehalts wurde nach Herstellerangaben mittels des NanoPhotometers™ Pearl durchgeführt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C bis zur Herstellung der cDNA.

II) Herstellung der cDNA

Die Proben wurden in RNase-freien PCR-Gefäßen angesetzt. Je Probe wurde 1 µg RNA eingesetzt und mit DEPC-H₂O auf 22,6 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Master-Mix für die cDNA-Synthese angesetzt. Es wurden je 37,4 µL Master-Mix in die PCR-Gefäße auf die RNA-Probe gegeben. Die RNA der

Proben wurde in einem Zyklus zu cDNA transkribiert. Anschließend wurde die cDNA bei -20 °C bis zur Durchführung der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) zwischengelagert.

Ansatzprotokoll für den Master-Mix: Je Probe (+10 % Verlust)

10x Puffer	6,0	µL
MgCl ₂	13,2	µL
dNTP's	12,0	µL
Random Hexamer	3,0	µL
RNAse Inhibitor	1,2	µL
Reverse Transkriptase	2,0	µL

PCR-Programm zur cDNA-Synthese

25 °C 10 min

42 °C 60 min

95 °C 5 min

4 °C ∞, keine Zyklen

III) Durchführung der qRT-PCR

Jede Probe wurde in Triplikaten gemessen. Als Kontrolle wurde außerdem ein Triplikat mitgeführt, bei dem statt cDNA DEPC-H₂O eingesetzt wurde. Der Master-Mix für die PCR wurde nach folgendem Schema hergestellt:

Ansatzprotokoll für den Master-Mix: Je Probe (+ 10 % Verlust)

Taq-Man Universal Master Mix	6,25	µL
Primer	0,625	µL
DEPC-H ₂ O	0,625	µL

Es wurden jeweils 7,5 µl Master-Mix in die Wells der PCR-Platte pipettiert, und dazu jeweils 5 µl cDNA-Probe (entspricht 83,33 ng RNA) gegeben. Anschließend wurde die Platte mit einem Klebefilm luftdicht verschlossen und die Proben durch kurze Zentrifugation auf den Boden der Wells gebracht. Die Platten wurden in den *ABI 7500 Real Time qPCR Thermal Cycler* eingelegt und das PCR-Programm nach Herstellerangaben gestartet.

PCR-Programm für die RT-qPCR

50 °C 2 min
95 °C 10 min
95 °C 15 sec
60 °C 1 min 40 Zyklen

Die komparative $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur qRT-PCR Analyse

Die $\Delta\Delta C_T$ -Methode ist eine verbreitete Methode, um eine relative Veränderung von Genexpressionsmustern zu analysieren [Livak KJ et al. 2001]. Sie beruht auf einem Algorithmus, der approximativ die relative Genexpression anhand eines Kalibrators bestimmt. Daher wird die Expression des Zielgens als das n-fache der Kalibrator-Probe angegeben. Die Grundvoraussetzung zur Berechnung ist eine annähernd gleiche Amplifizierungs-Effizienz während der PCR.

Die Echtzeit-PCR (*Real Time*, RT) gibt Auskunft über die Quantität des Zielgens (*Quantity*, q), in dem nach jedem Zyklus der PCR die Fluoreszenz-Intensität gemessen wird. Dafür werden Primer eingesetzt, die mit einem Reporter (Fluoreszenz-Signal) und einem Quencher ausgestattet sind. Während der Polymerase-Reaktion wird das Fluoreszenz-Signal durch Hydrolyse freigesetzt, wodurch der Quencher seine Wirkung verliert. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur Menge des Zielgens und steigt exponentiell mit jedem PCR-Zyklus.

Um die Expressionsmuster vergleichen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Schwellenwert gesetzt. Dieser wurde so gewählt, dass die Fluoreszenz-Intensität unterhalb des exponentiellen Bereichs, aber oberhalb des Hintergrundrauschens liegt. Anhand des Thresholds wurde der C_T -Wert für jede einzelne Probe bestimmt. Der C_T -Wert steht also für die fraktionelle Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz der Probe den Threshold erreichte. Die Software des verwendeten qRT-PCR Systems setzte den Threshold automatisiert und berechnete auf der Grundlage den C_T -Wert. Im Anschluss wurden die C_T -Werte zur weiteren Berechnung in Excel eingefügt.

Auf jeder PCR-Platte wurden ein Primer und das Referenzgen GAP-DH als Referenz gemessen. Außerdem wurden alle Proben in Triplets analysiert. Anhand der C_T -Werte für Primer und GAP-DH wurde der ΔC_T -Wert berechnet:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Primer}) - C_T (\text{GAP-DH})$$

Für jedes Tier wurde der Mittelwert der ΔC_T -Werte berechnet (MW ΔC_T). Die Sham-operierte Gruppe wurde dabei als Kalibrator eingesetzt. Dafür wurde der ΔC_T -Wert einer Probe als Kalibrator ausge-

wählt, der am nächsten zum Gruppendurchschnitt lag. Für den Wert von $\Delta\Delta C_T$ wurde dieser Probe der Wert „1“ zugewiesen. Daraufhin wurde der $\Delta\Delta C_T$ -Wert für jedes Tier wie folgt berechnet:

$$\Delta\Delta C_T = MW \Delta C_T (\text{Probe}) - MW \Delta C_T (\text{Kalibrator})$$

Bei der Kalibrator-Probe ist also „0,0“ das Ergebnis von $\Delta\Delta C_T$. Anschließend wurde anhand dessen die relativen Quantität (RQ) bestimmt nach folgender Formel:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Die Expression des Zielgens wird also als n-Faches der Kalibrator-Probe ausgedrückt. Auf die Weise wurde die relative Genexpression aller Tiere für die verschiedenen Primer berechnet. Zur statistischen Auswertung wurden die einzelnen Werte in die Software GraphPad Prism übertragen.

Material, Substanzen und Geräte zur Bestimmung der mRNA-Expression

Material, Substanzen und Geräte	Firma
ABI 7500 Real Time qPCR Thermal Cycler	Applied Biosystems, Darmstadt DE
Chloroform	Sigma Aldrich, München, DE
Micra D-8 Power Homogenisator	Art Labortechnik München, DE
DEPC-H ₂ O	Applied Biosystems, Darmstadt DE
Ethanol, absolut	Sigma Aldrich, München, DE
GeneAMP 10x PCR Buffer II + MgCl ₂ (25 mM)	Applied Biosystems, Darmstadt DE
GeneAMP dNTP Blend 10 mM	Applied Biosystems, Darmstadt DE
Isopropylalkohol	Sigma Aldrich, München, DE
MicroAmp Clear Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt DE
MicroAmp, Fast 96-Well Reaction Plate 0,1 mL	Applied Biosystems, Darmstadt DE
MuLV Reverse Transcriptase	Applied Biosystems, Darmstadt DE
Random Hexamers	Applied Biosystems, Darmstadt DE
RNAlater®	Qiagen, Hilden, DE
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, Darmstadt DE
Taq Man Universal Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt DE
Trizol-Reagent	Invitrogen, Darmstadt DE

Primer (Maus)

Ziel-RNA (Part-Nr)	Reporter	Firma
Edn-1 (Mm00438656_m1)	FAM	Applied Biosystems, Darmstadt DE
GAP-DH (4352339E)	VIC	Applied Biosystems, Darmstadt DE
IL-1 β (Mm00434228_m1)	FAM	Applied Biosystems, Darmstadt DE
Tgf- β 1 (Mm00441724_m1)	FAM	Applied Biosystems, Darmstadt DE
Tnf- α (Mm00443258_m1)	FAM	Applied Biosystems, Darmstadt DE

3.6 Blut- und Plasmatests

Um den Gerinnungsstatus und die effiziente FXIIa-Inhibition zu evaluieren, wurde das Blut bzw. Zitratplasma der Versuchstiere untersucht. Die Glas-induzierte Gerinnungszeit diente dem Nachweis der Fremdoberflächen-induzierten Koagulation und wurde mit Vollblut durchgeführt. Für alle anderen Tests wurde aus Zitratblut Plasma nach dem folgenden Protokoll gewonnen: In die Blutabnahme-Spritze wurde 1 Teil Natriumzitrat vorgelegt und 9 Teile Vollblut aus dem Versuchstier entnommen. Das Zitratblut wurde in geeigneten Gefäßen bei 330 x g für 8 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde das erhaltene Zitratplasma vorsichtig abgenommen und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert.

3.6.1 Glas-induzierte Gerinnungszeit von Vollblut (WBCT)

Die Glas-induzierte Gerinnungszeit von Vollblut (*Whole Blood Clotting Time*; WBCT) wurde zur Evaluierung der Kontakt-vermittelten Koagulation in Studien mit Kaninchen eingesetzt. Im Wasserbad bei 37,5 °C wurden Gewinde-Schraubgläser ohne Deckel vorgewärmt. Zum gewünschten Zeitpunkt im Verlauf der Studie wurde dem Kaninchen 0,5 mL Vollblut entnommen, in das Schraubglas gegeben, leicht geschwenkt und bei 37,5 °C inkubiert. Gleichzeitig bei Kontakt zwischen Blut und Schraubglas wurde ein Zeitmesser gestartet. Alle 30 sec wurde das Schraubglas geschwenkt und makroskopisch überprüft, ob eine Koagulation eingetreten war.

3.6.2 Aktivierte Partielle Thromboplastinzeit (aPTT)

Dieser Standardtest ist auch unter aktivierte partielle Prothrombinzeit (aPTT) bekannt. Im Gegensatz zur Prothrombinzeit (PT) lässt dieser Test auf die Funktionalität des intrinsischen Gerinnungsweges

rückschließen. Die aPTT wird herangezogen zur Kontrolle einer erfolgreichen Heparinbehandlung oder einer thrombolytischen Therapie. Außerdem erlaubt eine Verlängerung des Wertes die Erkennung einer Gerinnungsstörung. Für die Bestimmung der aPTT wurde Zitratplasma durch die Zugabe von Phospholipiden (PF-3), Kalzium und Kaolin als Oberflächen-aktivierende Komponente wieder in einen gerinnungsfähigen Zustand gebracht. Die Zeit bis zum Eintreten der Gerinnung wird über einen Sensor gemessen. Für einen gesunden Erwachsenen liegt der Normwert bei 20 bis 38 Sekunden.

Dabei üben verschiedene Faktoren Einfluss auf das Messergebnis aus. Eine Defizienz an Gerinnungsfaktoren (FI, FII, FVIII, FIX, FX, FXI, FXII, HK und prä-KK) bewirkt eine Verlängerung der Messzeit. Eben solches gilt für eine erworbene Dysfunktion von Gerinnungsfaktoren, zum Beispiel durch eine Cumarin-Therapie. Des Weiteren kann mit der aPTT der Gerinnungsstatus bei einer Heparinbehandlung überprüft werden.

3.6.3 Prothrombinzeit (PT)

Bei der Bestimmung der Prothrombinzeit wird die Funktionalität des extrinsischen Koagulationsweges untersucht. Standardmäßig wird auch für die PT Zitratplasma eingesetzt. Zu Beginn des Tests wurde das Zitratplasma rekalkifiziert, sodass den Faktoren VIIa, IXa und Xa ausreichend Kalzium zur Verfügung stand. Mit der Zugabe von TF wird die extrinsische Koagulation gestartet. Der Messparameter ist die Zeit bis zur Detektion von Fibrinfäden, die ein Sensor mechanisch oder photometrisch erfasst. Für humanes Blut gilt ein Wert zwischen 11 bis 16 sec als normal. Alle Messungen der PT für diese Arbeit wurden automatisiert im BCS XP® von Siemens Healthcare Diagnostics GmbH durchgeführt.

3.6.4 FXIIa-Aktivitätstest

Dieser Test basiert auf dem gleichen Prinzip wie die aPTT: mit Zitrat antikoaguliertes Blut wird rekalkifiziert. Über einen thrombotischen Reiz (Phospholipide) wird der intrinsische Schenkel der Gerinnungskaskade induziert. Als Vergleich dient FXII-Mangelplasma und Standard-Humanplasma (SHP), sodass das Messergebnis in Prozent SHP angegeben wird. Die Messung erfolgte automatisiert über das BCS XP® von Siemens Healthcare Diagnostics GmbH.

3.6.5 Differentialblutbild

Das Differentialblutbild gibt Auskunft über den globalen Gesundheitsstatus eines Organismus. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Differentialblutbild zur Herstellung von PRP mit einer definierten Thrombozytenzahl eingesetzt und supplementär in den Thrombose-Studien im Kaninchen-Modell durchgeführt.

Die Analyse erfolgte automatisiert über den Scil Vet ABC (scil animal care company GmbH). Das Testsystem benötigt wenige Mikroliter EDTA-Blut und nutzt das Impedanzmessverfahren zur Bestimmung der Zellzahlen. Dabei verfügt das Gerät über die Normalwerte der gängigen Versuchstierarten und gibt Abweichungen an.

Material und Geräte für Blut- und Plasmatests

Material und Geräte	Firma
BCS XP®System	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, DE
Kalziumchloridlösung	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, DE
Einmalspritzen, 1 mL	B Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
FXII Mangelplasma	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, DE
Gewinde-Schraubgläser 5 ml	Scherf Präzision Europa GmbH, Meiningen, DE
Pathromtin SL	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, DE
Scil Vet ABC	scil animal care company GmbH, Viernheim, DE
Standard Human Plasma	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, DE
Waschlösung	Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, DE

3.7 Statistische Methoden

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm Graph Pad Prism, Version 5.04 erstellt. Für den Vergleich verschiedener Gruppen wurde zunächst die parametrische Verteilung überprüft (Kolmogorov-Smirnov Test bei $n < 6$ und D'Agostino and Pearson Omnibus Normalitätstest für $n > 6$), um die parametrische Verteilung zu analysieren.

Anschließend wurden die normal verteilten Resultate der behandelten Versuchsgruppen über den unpaired t-Test mit Welchs Korrektur mit der Positivkontrollgruppe verglichen. Nicht-normalverteilte Daten wurden mittels Mann-Whitney Test auf signifikante Unterschiede zwischen „Behandelt versus Positivkontrolle“ überprüft. Ein signifikanter Unterschied wurde definiert als ein Wert von $p < 0,05$. Die Kaplan-Meyer-Kurven der Thrombosemodelle wurden anhand des Log rank-Tests verglichen. Alle Ergebniszahlen sind als Mittelwert \pm *standard error of the mean* (SEM) angegeben.

Einbezug der Sterblichkeitsrate im murinen Schlaganfallmodell

Zur Untersuchung der Hypothese, dass eine FXIIa-INH-Behandlung die Schlaganfall-induzierten Symptome verbessern kann, wurde zunächst die deskriptive Statistik ausschließlich mit den Daten der überlebenden Tiere angefertigt. Auf dieser Basis wurden alle angegebenen Mittelwerte \pm SEM berechnet.

Um jedoch außerdem einen Unterschied in zwischen den behandelten Gruppen und der Positivkontrolle unter Einbezug der Mortalität statistisch zu analysieren, wurde der p-Wert gesondert berechnet. Hierfür wurde den nicht-überlebenden Tieren ein schlechterer Wert zugeordnet, als das schlechteste überlebende Tier erreichte. Anschließend wurde die statistische Analyse mittels des Mann-Whitney Test (Rang-Test) durchgeführt, um den p-Wert zu berechnen. Die Anzahl der verstorbenen Tiere wurde in der deskriptiven Statistik zusätzlich dargestellt.

4. ERGEBNISSE

Zur tieferen Untersuchung der Rolle von FXIIa in einer Thrombusbildung wurde in der vorliegenden Arbeit der anti-FXIIa MAb 3F7 in murinen Modellen der arteriellen und venösen Thrombose auf seine Wirksamkeit evaluiert (Kap. 4.1). Um die Erkenntnisse in einem nicht-Nager-Modell zu vertiefen, wurde der anti-FXIIa MAb 3F7 zusätzlich in Thrombose-Modellen in der Spezies Kaninchen getestet (Kap. 4.2). Außerdem wurde in dieser Arbeit die Wirksamkeit der FXIIa-Inhibitoren rHA-Infestin-4 und anti-FXIIa MAb 3F7 in einem murinen Schlaganfall-Modell evaluiert (Kap. 4.3).

4.1 Wirksamkeit der FXIIa-Inhibition in murinen Thrombosemodellen

In internen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde die Wirksamkeit der FXIIa-Inhibitoren *in vitro* und *in vivo* pharmakologisch evaluiert. Die Dosierungen für die *in vivo*-Studien der vorliegenden Arbeit wurden anhand dieser Grundlagen gewählt. Ziel der im folgenden Kapitel dargelegten Resultate war die Untersuchung der antithrombotischen Wirksamkeit durch den FXIIa-INH anti-FXIIa MAb 3F7 in verschiedenen Mausmodellen der arteriellen und venösen Thrombose, wobei der thrombotische Reiz variiert wurde.

4.1.1 Aortenkompressionsmodell

Im Aortenkompressionsmodell wurde über eine starke mechanische Kontusion der *Aorta abdominalis* ein Reiz für einen okklusiven Thrombus in Wildtyp-Mäusen gesetzt. Anhand dessen wurde die anti-thrombotische Wirkung des anti-FXIIa MAb 3F7 untersucht. Dazu wurde mittels einer Flusssonde gemessen, ob und wann eine thrombotische Gefäßokklusion stattfand. Anti-FXIIa MAb 3F7 wurde in dem Versuch i.v. in den Dosierungen 10 mg/kg (n = 5) und 20 mg/kg (n = 11) appliziert. Zur Kontrolle erhielt eine weitere Gruppe isotonische Saline (n = 10). Alle Substanzen wurden im gleichen Applikationsvolumen pro Gewicht verabreicht.

Resultate

In der mit Saline behandelten Gruppe entwickelten 9 von 10 Tieren einen okklusiven Thrombus (Abbildung 18 A). Der Zeitpunkt der thrombotischen Okklusion lag dabei im Mittel bei $296,11 \pm 30,86$ sec. Für die Behandlung mit 10 mg/kg anti-FXIIa MAb 3F7 konnte entgegen der Erwartung kein

protektiver Effekt durch die FXIIa-Inhibition festgestellt werden. Die mittlere Zeit bis zur Okklusion war zwar mit $383 \pm 69,35$ sec etwas verlängert, unterschied sich jedoch nicht statistisch signifikant von der Saline-Gruppe. Eine Erhöhung der anti-FXIIa-Dosis (20 mg/kg) resultierte ebenfalls in einer thrombotischen Okklusion in der Mehrzahl der Tiere, wobei jedoch zwei von 11 Tieren geschützt waren. Dennoch lag die mittlere Okklusionszeit bei $281,1 \pm 46,75$ sec und war ebenfalls im Vergleich zur Saline-Gruppe statistisch nicht signifikant verändert.

Um die Aktivität des FXIIa-INH nach der Applikation zu überprüfen, wurden nach Versuchsende stichprobenartig Blutproben von den Tieren der Versuchsgruppen genommen und die aPTT im Plasma bestimmt (Abbildung 18 B). Die aPTT der Kontrollgruppe (Saline, n = 4) lagen bei $74,78 \pm 15,37$ sec,

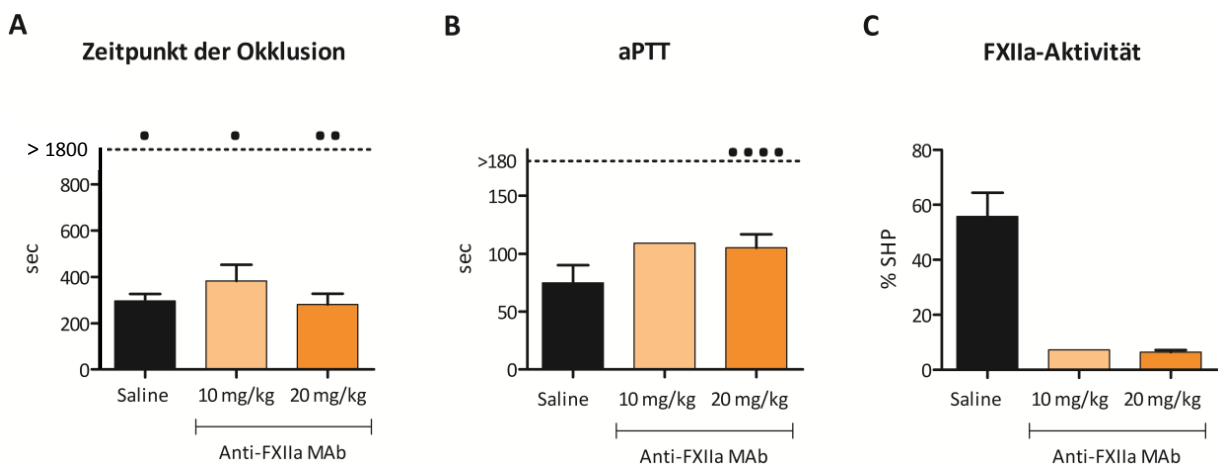


Abbildung 18: FXIIa-Inhibition mittels anti-FXIIa MAb 3F7 im Aortenkompressionsmodell

Die antithrombotische Wirkung des anti-FXIIa MAb 3F7 wurde in einem Mausmodell der arteriellen Thrombose untersucht. Hierfür wurde die Aorta abdominalis einer mechanischen Kontusion unterzogen. Die Tiere erhielten randomisiert 10 min vor der Verletzung Saline (n = 10), anti-FXIIa MAb 3F7 in der Dosierung 10 mg/kg (n = 5) oder 20 mg/kg (n = 11). Eine Ultraschallsonde detektierte für 30 min den Blutfluss im geschädigten Gefäß. Für jede Gruppe ist der Mittelwert \pm SEM für die okkludierten Gefäße angegeben. Die Punkte oberhalb der gestrichelten Linie zeigen die Anzahl der Tiere außerhalb der Beobachtungsphase. **A:** Zeitpunkt der thrombotischen Okklusion, gemessen in sec. Die gestrichelte Linie verdeutlicht das Ende des Beobachtungszeitraumes bei 1800 sec. Die Punkte oberhalb der Linie kennzeichnen Gefäße, bei denen keine Okklusion beobachtet wurde. **B:** aPTT, in Stichproben. Die aPTT wurde in sec gemessen, wobei die oberste Messgrenze bei 180 sec lag, gekennzeichnet durch die gestrichelte Linie. **C:** FXIIa-Aktivitätsbestimmung. Zum Vergleich wurden die murinen Plasmaproben gegen Standard Humanplasma (SHP) gemessen. Daher sind die Ergebnisse prozentual zu SHP angegeben.

und für die anti-FXIIa MAb-Gruppe (10 mg/kg) war die aPTT erhöht auf 109,1 sec (n = 1). In Übereinstimmung mit der 10 mg/kg Gruppe wurde bei 4 von 9 Tieren der 20 mg/kg Gruppe anti-FXIIa MAb 3F7 der Messbereich des Analysegerätes überschritten (n = 9). Im Mittel lag die aPTT der letzten Gruppe bei $141,3 \pm 5,03$ sec.

Noch deutlicher wurde die effektive FXIIa-Inhibition bei der Bestimmung der residualen FXIIa-Aktivität (Abbildung 18 C). Im Verhältnis zu SHP erreichte die Saline-Kontrollgruppe $48,91 \pm 4,48$ % SHP. Die FXIIa-INH-behandelten Gruppen lagen beide unter 7,5 % SHP, wobei 5 % SHP der unteren Messgrenze des Gerätes entspricht. Tiere unterhalb dieses Bereiches wurden nicht für die Berechnung des Mittelwertes berücksichtigt, da kein Zahlenwert vorliegt. Im Detail wurde für die niedrigere Dosierung (anti-FXIIa MAb 3F7 10 mg/kg) eine residuale FXIIa-Aktivität von $16,29 \pm 1,45$ % SHP beobachtet, wobei ein Tier einen Wert unterhalb der Messgrenze erreichte. Die Erhöhung der Dosis auf 20 mg/kg anti-FXIIa MAb 3F7 verringerte die FXIIa-Aktivität zusätzlich auf $12,31 \pm 1,42$ % SHP. Hier zeigten 8 Tiere einen Wert unterhalb der unteren Messgrenze. Diese Plasmatests zeigen, dass FXIIa effektiv in den getesteten Tieren inhibiert wurde. Dennoch wurde auch in der höchsten Dosierung kein protektiver Effekt durch die Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 in diesem Thrombosemodell beobachtet. Offenbar spielt der TF-induzierte Gerinnungsweg in diesem Thrombosemodell eine größere Rolle, als die FXIIa-vermittelte Thrombose. Dennoch ist zu erwähnen, dass eine Behandlung mit rHA-Infestin-4 hier schützend wirkte [May F et al. 2013].

4.1.2 Venöses Thrombosemodell

Die pathophysiologischen Prozesse einer Thrombose sind abhängig vom betroffenen Gefäßsystem. Im venösen System entwickelt sich eine Thrombose unter sehr viel niedrigeren Scherkräften, was sich auch auf das Wachstum und die Komponenten des Thrombus auswirkt. Die Auslöser einer venösen Thrombose sind zumeist Blutstasen. Darüber hinaus wird über die inflammatorische Prozesse eine NETose eingeleitet. Dabei setzen neutrophile Granulozyten ihre DNA mit anionischer Ladung frei, wodurch eine FXIIa-vermittelte Thrombusbildung gefördert wird [Fuchs T et al. 2012].

Ergänzend zu der Studie der FXIIa-Inhibition unter arteriellen Flussbedingungen wurde der anti-FXIIa MAb 3F7 in diesem Modell der venösen Thrombose in der Maus auf seine antithrombotische Effizienz hin untersucht. Anhand einer chemischen Reizung der Gefäßwand wurde in diesem Versuch ein thrombotischer Stimulus gesetzt. Dafür wurde die *V. cava caudalis* von Mäusen mit FeCl_3 (5 %) behandelt, was in der Positivkontrolle eine thrombotische Okklusion zur Folge hatte. In diesem

Modell wurde eine Okklusion als vollständig definiert, wenn der messbare Blutfluss länger als 2 min einen Wert unterhalb von 0,02 mL / min aufwies. Der Beobachtungszeitraum betrug 60 min nach Induzierung der Thrombose. Die Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 erfolgte i.v. in einer Dosierung von 10 mg/kg (n = 11) 20 min vor der Einleitung der venösen Thrombose. Zur Positivkontrolle erhielt eine weitere Gruppe (n = 10) das gleiche Volumen an isotonischer Saline. Die Mäuse wurden randomisiert den Versuchsgruppen zugeteilt.

Resultate

Bei der mit Saline behandelten Kontrollgruppe konnte bei 70 % der Tiere eine vollständige Okklusion innerhalb der Beobachtungsperiode nachgewiesen werden (Abbildung 19 A). Die statistische Analyse mittels Log rank-Test ergab eine hoch signifikante Differenz ($p = 0,0007$) zwischen der Positivkontrollgruppe und der mit anti-FXIIa MAb 3F7 behandelten Gruppe.

Die gemittelte Okklusionszeit lag bei $20,21 \pm 3,88$ min für diese Gruppe (Abbildung 19 B). Im Vergleich dazu waren alle mit anti-FXIIa MAb 3F7 behandelten Tiere (11 von 11) vor einer thrombotischen Okklusion des venösen Gefäßes innerhalb des Beobachtungszeitraumes geschützt. Außerdem ist zu erwähnen, dass trotz des erheblichen chirurgischen Eingriffes makroskopisch keine erhöhte Blutungsneigung in den mit FXIIa-INH behandelten Mäusen zu beobachten war.

Zusammen betrachtet weist dies darauf hin, dass der FXIIa-INH in diesem Modell der venösen Thrombose einen starken antithrombotischen Effekt ausübt. Die unbeeinflusste physiologische Hämostase in dieser Studie ist von Bedeutung.

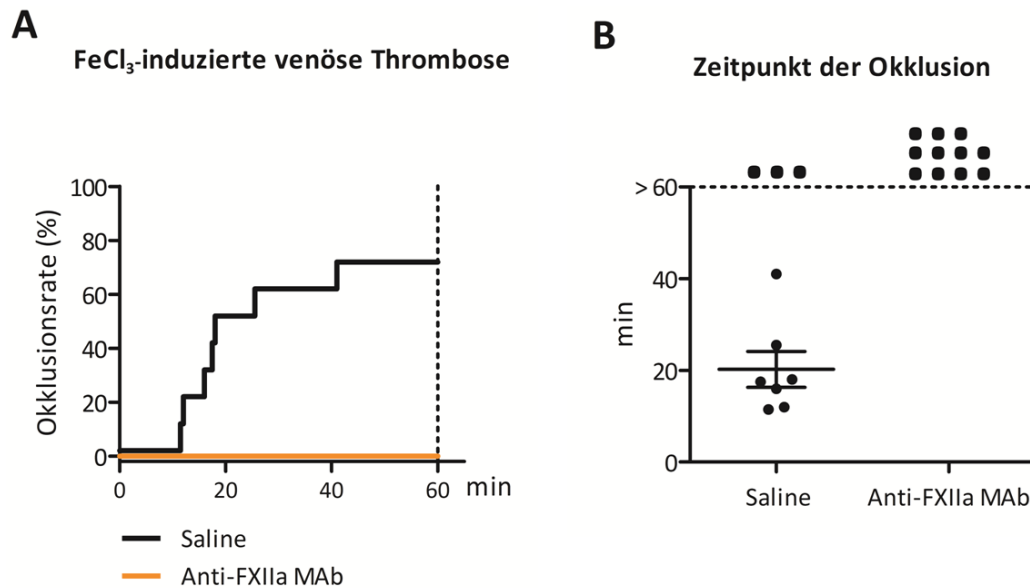


Abbildung 19: FXIIa-Inhibition mittels anti-FXIIa MAb 3F7 in einem venösen Thrombosemodell

Darstellung der antithrombotischen Wirksamkeit des anti-FXIIa MAb 3F7 im murinen Modell der FeCl_3 -induzierten venösen Thrombose. In diesem Modell wurde an der Vena cava caudalis mit FeCl_3 (5 %) ein thrombotischer Reiz gesetzt. Die Versuchsgruppen erhielten randomisiert prophylaktisch Saline ($n = 10$) oder anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg; $n = 11$). Über eine Ultraschallsonde wurde die Blutflussrate des geschädigten Gefäßes für 60 min aufgezeichnet. **A:** Okklusionsrate, Kaplan-Meier-Kurve. Jede Stufe der Kurve steht dabei für eine thrombotische Okklusion zum angegebenen Zeitpunkt. 100 % kennzeichnet alle in der Versuchsgruppe eingesetzten Tiere. Die gestrichelte Linie bei 60 min zeigt das Ende der Beobachtungsphase. Saline: Schwarze Kurve; Anti-FXIIa MAb 3F7: Orange Kurve. Der statistische Vergleich der Okklusionsrate wurde anhand des Log-Rank-Tests durchgeführt ($p = 0,0007$). **B:** Zeitpunkt der thrombotischen Okklusion. Jeder Punkt steht für ein Gefäß. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Ende des Beobachtungszeitraumes bei 60 min. Zusätzlich ist der Mittelwert \pm SEM aufgetragen. Die Normalverteilung der Okklusionszeiten wurde über den D'Agostino und Pearson Omnibus Normalitätstest überprüft und anschließend der Mann-Whitney Test zum Vergleich angewendet ($p = 0,0571$).

4.1.3 Arteriovenöses Shunt Modell in der Maus

In der Fachliteratur wird diskutiert, dass FXIIa maßgeblich zur pathologischen Thrombusbildung an Fremdoberflächen beiträgt. Das KPS wird in der klinischen Praxis beispielsweise durch Kontakt von Blut mit Verweilkathetern, künstlichen Herzklappen oder dem extrakorporalen Zirkulationssystem der ECMO aktiviert. Ziel dieser Studie war daher die antithrombotische Wirksamkeit von rHA-Infestin-4 (200 mg/kg) und anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) in einem Fremdoberflächen-basierten Thrombosemodell zu evaluieren. Dazu wurde in einem arteriovenösen (A/V) Shunt ein prokoagulant Glaselement eingebaut, das die negativ geladene Oberfläche zur Aktivierung des KPS bietet. Durch

Silikonkatheter wurde der Blutfluss aus der *Aorta abdominalis* durch das Glaselement in die *V. cava caudalis* geleitet. Dabei wurde per Ultraschallsonde der Blutfluss am Shunt kurz vor Wiedereintritt des Blutes in die Vene aufgezeichnet, um eine thrombotische Okklusion des Shunts überwachen zu können.

Wirksamkeit von rHA-Infestin-4 im murinen A/V Shunt-Modell

Zu Inhibition von FXIIa erhielten 10 Tiere rHA-Infestin-4 (200 mg/kg). Die Tiere der Positivkontrollgruppe (n = 10) erhielten isotonische Saline in gleichem Volumen. Eine weitere Gruppe (n = 3) erhielt Heparin (300 U/kg) als Negativkontrolle. Der Beobachtungszeitraum betrug 30 min. Nach Versuchsende wurde der Thrombus entnommen und gewogen.

Die mit Saline behandelte Kontrollgruppe zeigte wie erwartet eine stabile thrombotische Okklusion des A/V Shunts in den ersten 11 min der Beobachtungsphase (Abbildung 20 A). Die mittlere Zeit bis zur vollständigen Okklusion betrug $6,13 \pm 0,80$ min, wohingegen die heparinisierte Kontrollgruppe wie erwartet vollständig vor einem thrombotischen Ereignis geschützt war. Die statistische Auswertung mittels 1-way ANOVA (Kruskal-Wallis Test und Dunns Post Hoc Test) ergab für $p < 0,0001$ (Abbildung 20 B). Die mit rHA-Infestin-4 behandelte Gruppe war vergleichbar zu der mit Heparin behandelten Gruppe vor Okklusion des Shunts geschützt. In 10 von 10 Tieren zeigte die FXIIa-Inhibition eine verlässliche antithrombotische Wirksamkeit in diesem Kontakt-induzierten Thrombosemodell. Nur die mit Saline behandelte Gruppe entwickelte einen okkludierenden Thrombus, der ein mittleres Nassgewicht von $82,6 \pm 5,7$ mg besaß (Abbildung 20 C). In der rHA-Infestin-4-Gruppe sowie in der Heparin-Gruppe konnte auch nach Versuchsende makroskopisch kein Hinweis auf thrombotische Ablagerungen im Glaselement beobachtet werden. Es konnte bei den mit rHA-Infestin-4 behandelten Tieren makroskopisch keine erhöhte Blutungsneigung festgestellt werden, im Gegensatz zu einer sehr deutlichen Blutungsneigung der Heparin-Gruppe. Aus diesem Grund wurden lediglich 3 Tiere dieser Gruppe zugeordnet.

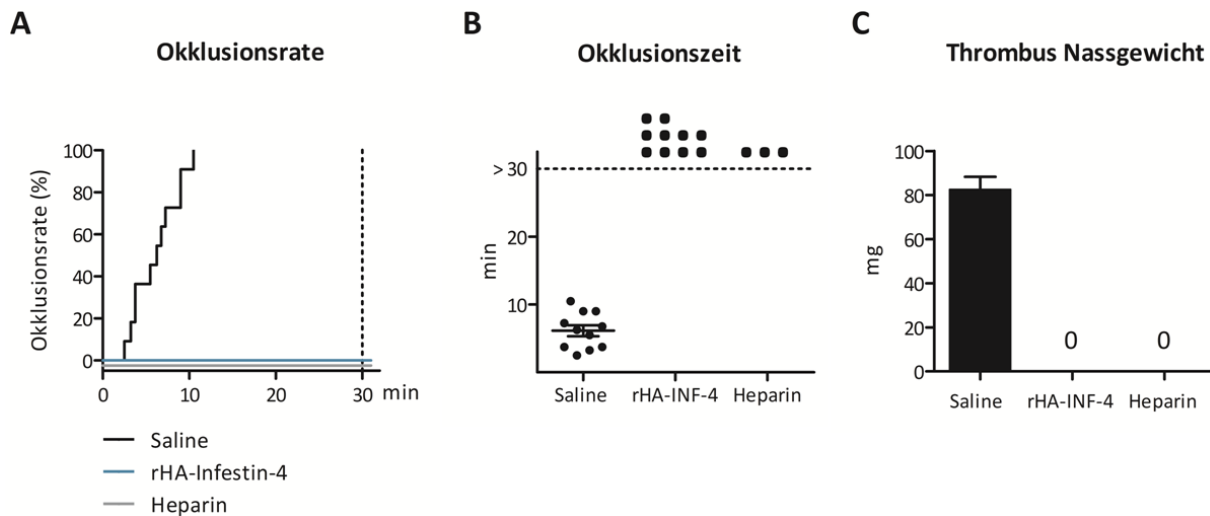


Abbildung 20: Wirksamkeit von rHA-Infestin-4 im murinen A/V Shunt-Modell

Die antithrombotische Wirkung von rHA-Infestin-4 (rHA-INF-4) wurde in einem Modell der Fremdoberflächen-induzierten Thrombose untersucht. Dafür wurde ein Silikonkatheter mit eingebautem Glaselement als Shunt zwischen Aorta abdominalis und V. cava caudalis verwendet. Das Glaselement diente als prokoagulante Oberfläche zur Aktivierung des KPS. Die Blutflussrate wurde mittels Ultraschallsonde für 30 min aufgezeichnet. Die Versuchsgruppen erhielten randomisiert 15 min vor Beginn des Blutflusses durch den A/V Shunt Saline ($n = 10$), rHA-Infestin-4 in der Dosierung 200 mg/kg ($n = 10$) oder Heparin 300 U/kg ($n = 3$). **A:** Okklusionsrate, Kaplan-Meier-Kurve. Jede Stufe der Kurve steht dabei für eine thrombotische Okklusion des Shunts zum angegebenen Zeitpunkt. Die schwarze Kurve kennzeichnet die thrombotischen Ereignisse in der Saline-Gruppe, die graue Kurve die der Heparin-Gruppe. Die blaue Kurve zeigt die Daten der mit rHA-Infestin-4 behandelten Gruppe an. Anhand des Log-rank Tests ergab sich $p < 0,0001$. **B:** Zeitpunkte der thrombotischen Okklusion in min. Jeder Punkt steht für ein Versuchstier. **C:** Nassgewicht der aus dem Glaselement extrahierten Thromben in mg. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Ende des Beobachtungszeitraumes. Zusätzlich ist der Mittelwert \pm SEM eingezeichnet. rHA-INF-4 = rHA-Infestin-4

Wirksamkeit des anti-FXIIa MAb 3F7 im murinen A/V Shunt-Modell

In diesem Modell der Fremdoberflächen-induzierten Thrombose wurde neben rHA-Infestin-4 außerdem der anti-FXIIa MAb 3F7 getestet. Dafür erhielten 10 Tiere anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg). Die Tiere der Positivkontrollgruppe ($n = 10$) erhielten isotonische Saline in gleichem Volumen. Eine weitere Gruppe ($n = 3$) erhielt Heparin (300 U/kg) zur Negativkontrolle. Der Beobachtungszeitraum betrug 30 min. Der Thrombus wurde nach Versuchsende aus dem Glaselement entnommen und gewogen.

Die Analyse zeigte in der Saline-Gruppe eine stabile Okklusion des A/V Shunts in 90 % der Tiere (9 von 10). Spätestens nach 23 min war bei den Gefäßen mit thrombotischer Okklusion der Blutfluss durch

den A/V Shunt vollständig versiegt (Abbildung 21 A). Die statistische Auswertung mittels Log-rank Test ergab für $p = 0,0012$. Durchschnittlich ereignete sich die thrombotische Okklusion in der Saline-Gruppe bei $15,1 \pm 2,55$ min (Abbildung 21 B). Wie erwartet waren die mit Heparin behandelten Tiere vollständig vor einer Thrombose über die gesamte Beobachtungszeit geschützt. Vergleichbar dazu wurde auch in der mit anti-FXIIa-MAb 3F7 behandelten Gruppe bei 80 % der Tiere (8 von 10) ein Schutz vor einer thrombotischen Okklusion über die Dauer von 30 min beobachtet. Lediglich in 2 mit FXIIa-INH behandelten Tieren wurde eine Okklusion beobachtet, die sich zeitlich nicht von der Saline-Gruppen Okklusionszeit unterschied. Die statistische Auswertung mittels *1-way ANOVA* (Kruskal-Wallis Test und Dunns Post Hoc Test) ergab für $p = 0,0036$ (Abbildung 21 A und B).

Alle Glaselemente wurden nach Versuchsende begutachtet. In der FXIIa-INH-Gruppe konnte bei 3 Glaselementen von Tieren ohne Okklusion kein Hinweis auf eine Thrombusbildung nachgewiesen werden. In 4 Glaselementen derselben Gruppe war makroskopisch im bauchigen Teil des Glaselements eine dünne Ablagerungsschicht aus thrombotischem Material zu erkennen. Die restlichen Tiere (3 von 10) entwickelten ein deutliches Gerinnsel durch den Kontakt zwischen Blut und Glas, der in 2 Tieren letztendlich zur Okklusion führte. Die Analyse der Thromben ergab für die mit Saline behandelte Gruppe ein Nassgewicht von $93,4 \pm 4,5$ mg, während in der mit anti-FXIIa MAb 3F7 behandelten Gruppe ein Mittelwert von $29,9 \pm 10,6$ mg gemessen werden konnte. Der statistische Vergleich mit der Saline-Gruppe mittels *1-way ANOVA* (Kruskal-Wallis Test und Dunns Post Hoc Test) ergab $p = 0,0008$. Wie erwartet wurde in der Heparin-Gruppe kein thrombotisches Material im Glaselement beobachtet (Abbildung 21 C).

Trotz der Gewebsverletzungen im Zuge der Operation konnte auch unter einer anti-FXIIa MAb 3F7-Behandlung keine erhöhte Blutungsneigung im Vergleich zur Positivkontrolle beobachtet werden, im Gegensatz zur Heparin-Gruppe mit deutlichem Blutverlust. Demzufolge scheint auch dieser Behandlungsansatz keinen negativen Einfluss auf die hämostatische Kapazität auszuüben.

Es wurde in beiden oben dargestellten Studien gezeigt, dass die FXIIa-Inhibition mittels rHA-Infestin-4 und anti-FXIIa MAb 3F7 im murinen A/V Shunt-Modell vor einer Kontakt-induzierten Thrombose schützt. Darüber hinaus wurde trotz des massiven chirurgischen Eingriffs makroskopisch keine Beeinträchtigung der physiologischen Hämostase observiert.

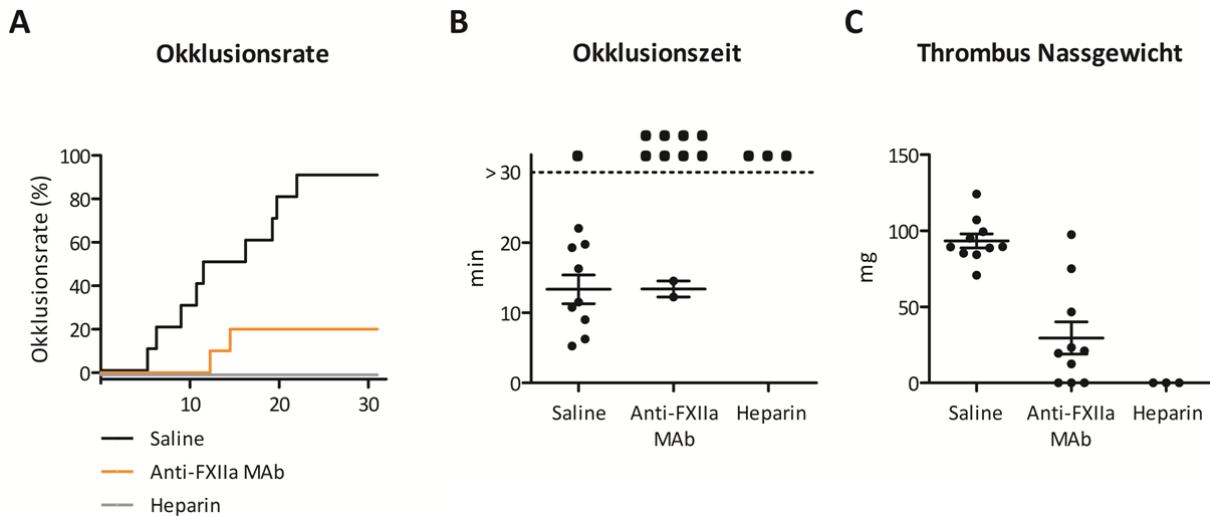


Abbildung 21: Wirksamkeit von anti-FXIIa MAb 3F7 im murinen A/V Shunt-Modell

Der anti-FXIIa MAb 3F7 wurde auf seine antithrombotische Kapazität in diesem Modell der Fremdoberflächen-induzierten Thrombose untersucht. Dafür wurde der Blutfluss durch einen Silikonkatheter mit eingebautem Glaselement (A/V Shunt) für 30 min aufgezeichnet. Die Versuchsgruppen erhielten randomisiert prophylaktisch 15 min vor Beginn des Blutflusses mit Saline ($n = 10$), anti-FXIIa MAb 3F7 in der Dosierung 10 mg/kg ($n = 10$) oder 300 U/kg Heparin ($n = 3$). **A:** Okklusionsrate, Kaplan-Meier-Kurve. Jede Stufe der Kurve steht für eine thrombotische Okklusion. Die schwarze Kurve kennzeichnet die Daten der Saline-behandelten Gruppe, die graue die der Heparin-behandelten Gruppe und die der anti-FXIIa MAb 3F7-behandelten Gruppe ist in orange eingetragen. Log-rank Test, $p = 0,0012$. **B:** Zeitpunkte der thrombotischen Okklusion in min. **C:** Nassgewicht der aus den Glaselementen entnommenen Thromben in mg. Da bei Heparin keine Thromben aufgetreten waren, wurde diese Gruppe hier nicht eingezeichnet. Statistik: 1-way ANOVA (Kruskal-Wallis Test mit Dunns Post Hoc Test), $p = 0,0008$. In den Grafiken **B**, **C**, und **D** steht jeder Punkt für ein Tier. Außerdem wurde der Mittelwert \pm SEM eingetragen. Alle p -Werte wurden im Vergleich zur Saline-Gruppe berechnet.

4.1.4 Erkenntnisse aus den Thrombose-Studien in Mäusen

Für die hier vorgestellten Studien wurden drei Modelle gewählt, die eine Thrombose auf unterschiedlicher Basis induzieren:

- 1) Das Aortenkompressionsmodell im arteriellen Zirkulationssystem.
- 2) Das FeCl_3 -Modell zur Induzierung einer Thrombose im venösen Zirkulationssystem.
- 3) Das Fremdoberflächen-induzierten Thrombosemodell unter annähernd arteriellen Flussbedingungen im A/V Shunt.

Bei der mechanischen Verletzung der Arterie im Kompressionsmodell (1) konnte durch einen prophylaktischen Behandlungsansatz mit anti-FXII-MAb 3F7 hier keine Verbesserung im Vergleich zu

Saline erzielt werden. In diesem Modell wird die Thrombose wahrscheinlich hauptsächlich über FXII-unabhängige Mechanismen wie TF eingeleitet und vorangetrieben.

Im Gegensatz dazu stand das murine Modell der venösen Thrombose, vermittelt durch eine chemische Reizung mit FeCl_3 (2). Unter Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 konnte deutlich eine schützende Wirkung vor einer thrombotischen Okklusion in den Tieren beobachtet werden.

Übereinstimmend mit dieser Beobachtung konnte auch im murinen Fremdoberflächen-induzierten Thrombosemodell die antithrombotische Wirksamkeit der verwendeten FXIIa-Inhibitoren bestätigt werden. In diesem Modell wurde ein thrombotischer Reiz durch den Kontakt zwischen Blut und negativ geladener Oberfläche (Glaselement) herbeigeführt. Die protektive Wirksamkeit von rHA-Infestin-4 verhinderte sowohl die Entstehung von thrombotischem Material im Glaselement, als auch eine Okklusion des A/V Shunts. Die mit anti-FXIIa MAb 3F7 behandelte Gruppe zeigte einen vergleichbaren Effekt, wenngleich die rHA-Infestin-4 Behandlung das größte antithrombotische Potential besaß. Unter der FXIIa-Inhibition mittels anti-FXIIa MAb 3F7 wurden in den Glaselementen Ablagerungen aus thrombotischem Material beobachtet, die jedoch nur bei zwei Mäusen (2 von 10) zu einer Okklusion des A/V Shunts führten. Für keine mit FXIIa-INH behandelte Gruppe konnte eine erhöhte Blutungsneigung beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte in den beschriebenen Modellen unter verschiedenen thrombotischen Reizen gezeigt werden, dass die besondere Stärke einer FXIIa-Inhibition bei der Fremdoberflächen-induzierten Thrombose liegt. Vermutlich spielt die Aktivierung von FXII im Aortenkompressionsmodell eine untergeordnete Rolle. Daher ist anzunehmen, dass die protektive Wirksamkeit durch FXIIa-INH limitiert wird durch die Art und Stärke des prothrombotischen Reizes.

Für rHA-Infestin-4 konnte bereits im Aortenkompressionsmodell sowie in der arteriellen und venösen Thrombose mittels FeCl_3 ein einzigartiges Wirkungsprofil gezeigt werden [Hagedorn I et al. 2010; Dissertation Jennifer Krupka, 2014]. Die Erkenntnisse der rHA-Infestin-4-Wirkung konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch in der Fremdoberflächen-induzierten Thrombose des A/V Shunts erneut erweitert werden. Die Untersuchungen zur antithrombotischen Wirkung des anti-FXIIa MAb 3F7 zeigten einen vergleichbaren Behandlungserfolg, der im FeCl_3 -induzierten venösen Thrombosemodell detektierbar war.

Um den speziesübergreifenden antithrombotischen Effekt zu belegen und gleichzeitig die residuale hämostatische Kapazität einzelner Tiere zu überprüfen, wurde die FXIIa-Inhibition in Modellen mit

Kaninchen als Vertreter einer nicht-Nager Spezies durchgeführt. Diese Studien werden im folgenden Kapitel dargelegt.

4.2 Wirksamkeit der FXIIa-Inhibition in Thrombosemodellen im Kaninchen

4.2.1 Simultane arterielle und venöse Thrombose

Das Modell der simultanen Thrombose vereint die Induzierung einer Thrombose mittels eines chemischen Reizes (FeCl_3 , 70%) im arteriellen System mit einer venösen Stase als prokoagulanten Reiz. Außer der arteriellen Okklusionsrate und des Thrombus Nassgewichts (venöse Stase) wurde in diesem Modell zusätzlich die hämostatische Kapazität der Tiere über die Glas-induzierte Gerinnung mit Vollblut, die Ohrblutungszeit und den Nierenblutungstest bestimmt. Des Weiteren wurde die PT und die effektive FXIIa-Inhibition durch anti-FXIIa MAb 3F7 mit Hilfe von aPTT-Messung und FXIIa-Aktivitätsbestimmung überprüft. Zur Positivkontrolle wurden 10 Kaninchen mit isotonischer Saline behandelt. 10 weitere Tiere erhielten 5 min vor Versuchsstart i.v. eine prophylaktische Applikation des anti-FXIIa MAb 3F7 (7 mg/kg). An beiden *Aa. femorales* wurde mit FeCl_3 (70 %) eine Thrombose induziert. Die Blutflussrate in den chemisch gereizten Arterien wurde mittels Ultraschallsonde aufgezeichnet.

Gleichzeitig wurde in einem etwa 25 mm langen Stück der linken *V. jugularis externa* eine Stase eingeleitet. Zur Evaluation der Wirksamkeit von FXIIa-INH auf die venöse Stase-vermittelte Thrombose wurde das Thrombusgewicht nach 180 min Stase aus dem Venensegment entnommen sowie das Nassgewicht bestimmt. Um den Einfluss des FXIIa-Inhibitors auf die physiologische Hämostase zu untersuchen, wurde die Ohrblutungszeit zu den Zeitpunkten -30 min (Baseline), 0 min (nach Applikation) und 180 min (nach Versuchsende) bestimmt. Außerdem wurde zu den gleichen Zeitpunkten die Glas-induzierte Gerinnung mit Vollblut (WBCT) *in vitro* bestimmt. Anschließend wurde für das Nierenblutungsmodell ein Schnitt definierter Länge und Tiefe in die linke Niere durchgeführt. Die Zeit bis zur Hämostase und das Volumen des ausgetretenen Blutes wurden bestimmt. Zusätzlich wurden Zitratplasma-Proben zu den Zeitpunkten -30, 0, 90 und 180 min entnommen, die im Anschluss auf aPTT, PT und FXIIa-Aktivität untersucht wurden.

Resultate

Im Folgenden werden zunächst die Resultate der arteriellen Thrombose dargestellt, gefolgt von der Auswertung der venösen Stase. Anschließend wird auf die Daten der Hämostase-Tests und die Analyse der Plasma-Parameter eingegangen.

Bei der arteriellen Thrombose entwickelten in der Kontrollgruppe 80 % (8 von 10 Tieren) eine stabile Okklusion der Femoralarterien (Abbildung 23 A). Da eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde, ist hier der Mittelwert beider Gefäße aufgetragen. Falls bei einem Tier ein offenes und ein okkludiertes Gefäß beobachtet wurden, wurde dies dennoch als „offen“ definiert, da ein antithrombotischer Effekt sichtbar war.

Der statistische Vergleich mittels Log-rank Test zwischen Positivkontrolle und FXIIa-INH-Gruppe ergab für $p = 0,0031$. In der Saline-Gruppe betrug die durchschnittliche Zeit bis zur thrombotischen Okklusion $41,72 \pm 5,17$ min. Im Vergleich dazu waren alle (10 von 10) Tiere der mit anti-FXIIa MAb 3F7 behandelten Gruppe vor einer thrombotischen Okklusion geschützt.

Der Gewichtsvergleich der venösen Thromben ergab jedoch keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 23 B). In der Saline-Gruppe betrug das Thrombus-Nassgewicht durchschnittlich $48,70 \pm 9,55$ mg und in der anti-FXIIa MAb 3F7-Gruppe $44,08 \pm 10,93$ mg. Mittels t-Test mit Welch's Korrektur ergab sich für $p = 0,7543$.

Zusammen betrachtet deutet dies darauf hin, dass der FXIIa-INH in diesem Kaninchen-Modell eine profunde protektive Wirksamkeit in der chemisch-induzierten Thrombose unter arteriellen Flussbedingungen aufweist. Im Gegensatz dazu scheint der anti-FXIIa MAb 3F7 keinen Effekt auf die Stase-induzierte Thrombose auszuüben, da sich das Gesamtgewicht der Thromben nicht signifikant unterschied.

Um den potenziellen Effekt von anti-FXIIa MAb 3F7 auf die physiologische Hämostase zu überprüfen, wurde der Ohrblutungstest zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation durchgeführt. Dieser Test demonstriert die Zeit bis zur Hämostase nach einer oberflächlichen Hautverletzung. Die Auswertung der Ohrblutungszeiten zeigte zu Beginn und beim Zeitpunkt 180 min keine signifikante Differenz zwischen der Kontroll- und der behandelten Gruppe. Zum Zeitpunkt -30 min wurde in der Saline-Gruppe eine durchschnittliche Zeit bis zur Hämostase von $1,70 \pm 0,16$ min versus $1,70 \pm 0,11$ min der anti-FXIIa MAb 3F7-behandelten Gruppe gemessen. Unmittelbar nach der Applikation (0 min) betrug die Ohrblutungszeit in der Saline-Gruppe unverändert $1,70 \pm 0,23$ min versus $2,00 \pm 0,16$ min

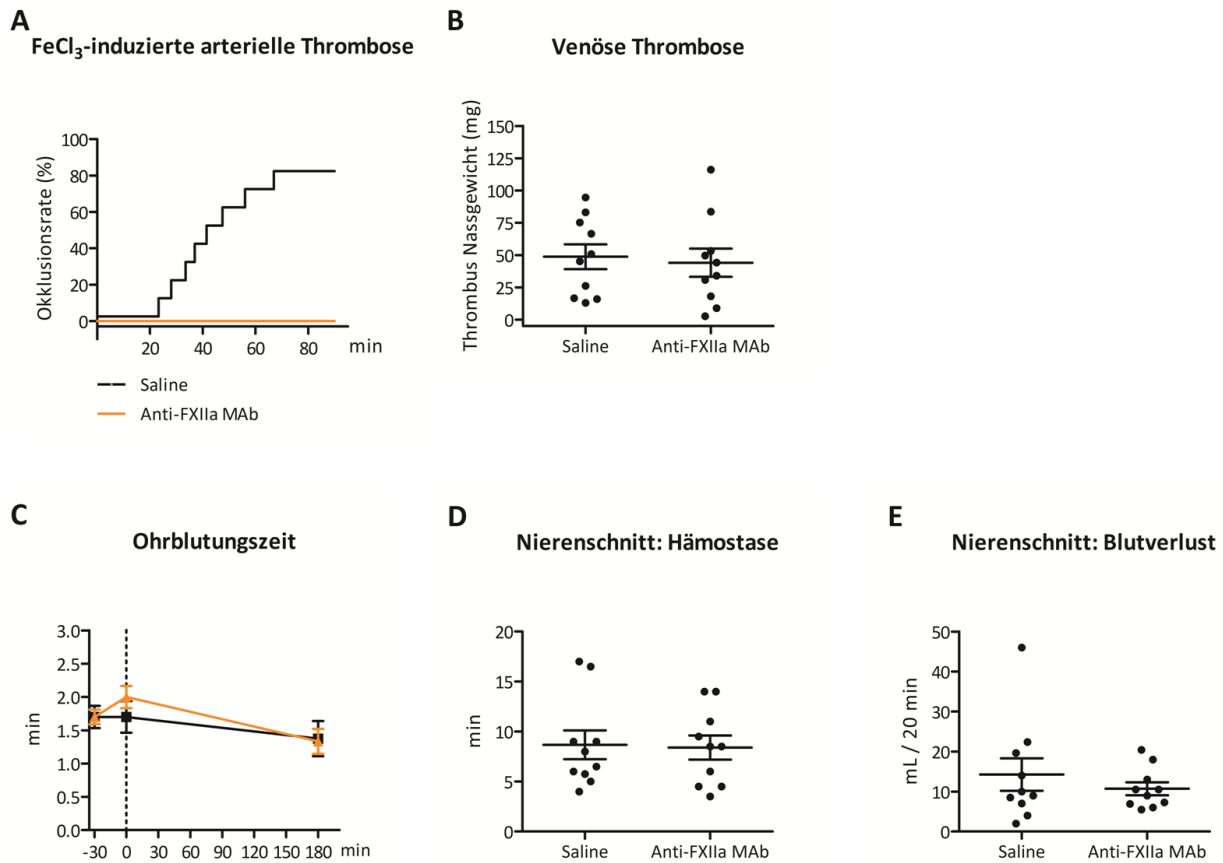


Abbildung 22: Wirksamkeit des anti-FXIIa MAb 3F7 im Modell der arteriellen und venösen Thrombose im Kaninchen

In diesem Modell wurde die arterielle Thrombose durch FeCl₃ (70 %) in beiden Femoralarterien induziert. Eine Ultraschallsonde zeichnete die Blutflussraten für 90 min auf. Gleichzeitig wurde eine Stase (180 min) in der V. jugularis veranlasst. Während des Versuchs wurde zu den Zeitpunkten prä-Applikation (-30 min), unmittelbar nach Applikation (0 min) und zu Versuchsende (180 min) die hämostatische Kapazität über die Ohrblutungszeit bestimmt. Im Anschluss wurde außerdem der Nierenblutungstest durchgeführt, der ebenfalls zur Beurteilung der hämostatischen Kapazität diente. **A:** Okklusionsrate in den Femoralarterien. Jede Stufe der Kurve steht dabei für eine thrombotische Okklusion zum angegebenen Zeitpunkt. 100 % kennzeichnet alle in der Versuchsgruppe eingesetzten Tiere. Die gestrichelte Linie bei 90 min kennzeichnet das Ende der Beobachtungsphase. Saline: Schwarze Kurve; Anti-FXIIa MAb 3F7: Orange Kurve. Log-rank Test, $p = 0,0031$. **B:** Nassgewicht der venösen Thromben in mg, wobei jeder Punkt für einen Thrombus steht. **C:** Ohrblutungstest. Die Zeit bis zur Hämostase ist in min angegeben und die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt 0 min (nach Applikation). Die Kurve in schwarz zeigt die Mittelwerte der Saline-Gruppe an, während die mit anti-FXIIa-behandelte Gruppe in orange dargestellt ist. Zum Zeitpunkt „0 min“ wurde über den Mann-Whitney-Test $p = 0,1149$ ermittelt. **D** und **E:** Nierenblutungstests. Jeder Punkt steht für ein Tier. Die Zeit bis zur Hämostase (**D**) ist in min angegeben. Analyse mittels t-Test für unverbundene Stichproben, $p = 0,8854$. Das Volumen des ausgetretenen Blutes wurde in mL/20 min Beobachtungsdauer aufgetragen. Mann-Whitney Test, $p = 0,8205$ (**E**). **B -E:** Alle Angaben in Mittelwert \pm SEM.

der anti-FXIIa MAb 3F7-behandelten Gruppe (Abbildung 22 C). Dem zufolge war die Ohrblutungszeit lediglich zum Zeitpunkt 0 min in der anti-FXIIa MAb 3F7-Gruppe leicht erhöht. Die statistische Analyse mittels Mann-Whitney-Test ergab hier für $p = 0,1149$. Bei Versuchsende wurden in beiden Gruppen erneut vergleichbare Ohrblutungszeiten gefunden. In der Saline-Gruppe wurde eine Hämostase nach $1,37 \pm 0,26$ min detektiert versus $1,33 \pm 0,18$ min in der anti-FXIIa MAb 3F7-behandelten Gruppe. Darüber hinaus wurde nach 180 min der Nierenblutungstest durchgeführt (Abbildung 22 D und E). Die definierte Verletzung der gut perfundierten Niere forciert einen Blutverlust. Die Menge des ausgetretenen Bluts ist abhängig vom unbeeinträchtigten Ablauf der biologischen Gerinnungsprozesse. Daher diente dieser Test als weiterer Indikator für die hämostatische Kapazität, die beispielsweise durch eine systemische Antikoagulation mit Heparin zu einem hohen Blutverlust führt. Die Zeit bis zum Eintritt der Hämostase in der Kontrollgruppe lag im Nierenblutungstest bei $8,7 \pm 1,4$ min. In der FXIIa-INH-Gruppe konnte eine Blutungszeit von gemittelt $8,4 \pm 1,2$ min festgestellt werden. Über einen t-Test mit Welchs Korrektur wurde für $p = 0,8854$ berechnet. Auch der Blutverlust wurde nach dem Nierenschnitt nicht durch die FXIIa-Hemmung beeinflusst: $14,3 \pm 4,1$ mL (Saline) versus $10,7 \pm 1,6$ mL (anti-FXIIa MAb 3F7). Die statistische Analyse ergab mittels Mann-Whitney Test hier für $p = 0,8205$. Diese Beobachtungen stimmen mit den Daten des Ohrblutungstests überein und demonstrieren, dass die Antithrombose mittels anti-FXIIa MAb 3F7 die physiologische Hämostase in den ausgewählten Tests nicht beeinflusst.

Mit den Plasmaproben konnte die erfolgreiche Hemmung des plasmatischen FXIIa zu den Zeitpunkten $t = 0$ und $t = 180$ min nachgewiesen werden (Abbildung 23 A). Für die mit FXIIa-INH behandelte Gruppe wurde bis zum Ende der Beobachtungszeit eine deutlich verlängerte aPTT beobachtet. Konsistent dazu war die FXIIa-Aktivität nach anti-FXIIa MAb 3F7-Applikation, die auf unter 30 % des SHP-Vergleichswertes gesunken war (Abbildung 23 B). Im Kontrast dazu stehen die PT-Messdaten, die sich zwischen den Gruppen nicht erkennbar unterschieden (Abbildung 23 C). Bei der WBCT wird die Gerinnung durch den Kontakt zwischen frischem Vollblut und Glas induziert. Vor der Behandlung war kein Unterschied zwischen den Gruppen zu beobachten (Abbildung 23 D). Unmittelbar nach der FXIIa-INH-Applikation konnte jedoch eine deutliche Verlängerung der WBCT detektiert werden: $t = 0$ min: $13,9 \pm 1,65$ min (anti-FXIIa MAb 3F7) versus $4,39 \pm 0,33$ min (Saline).

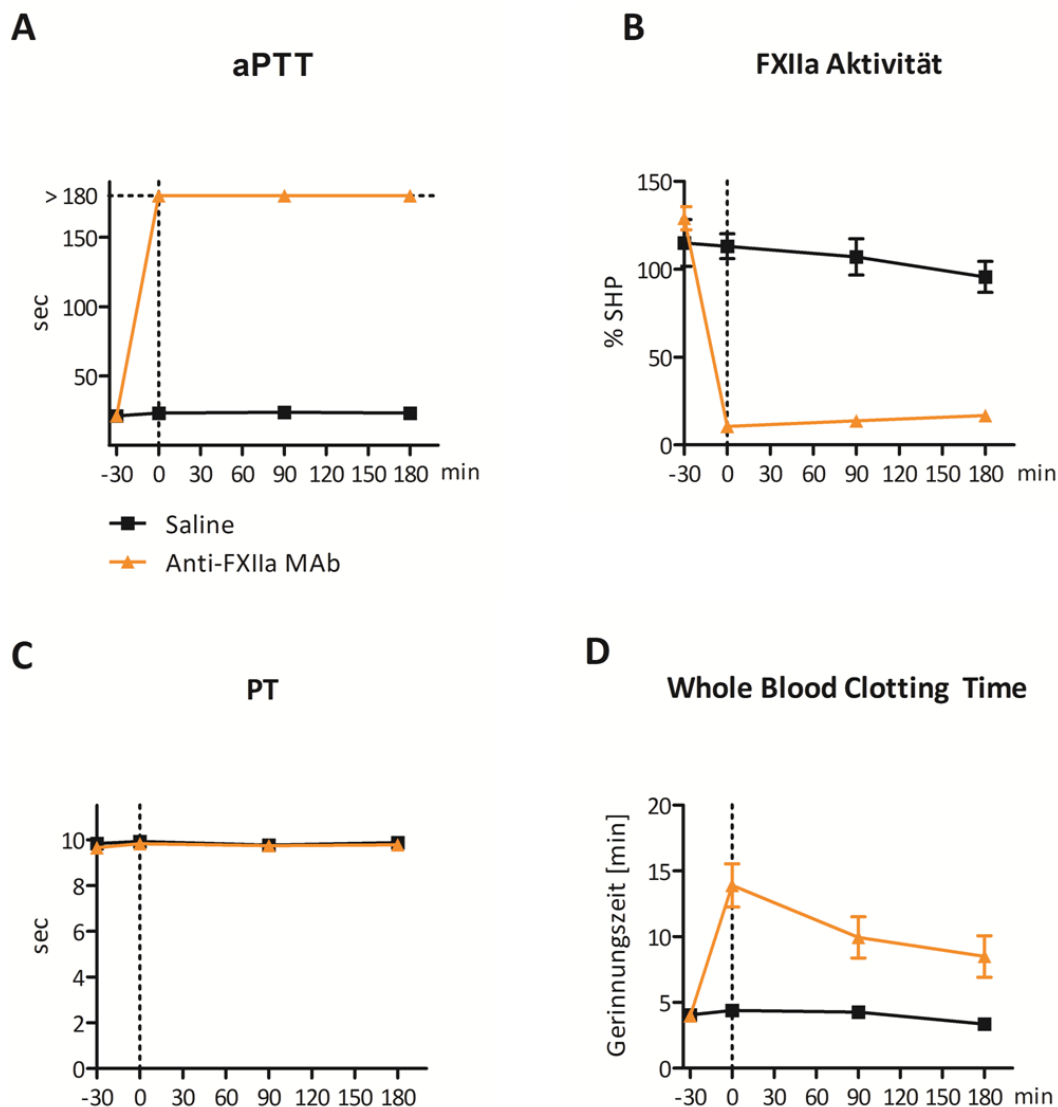


Abbildung 23: Blut- und Plasmatests zur Bestimmung des Gerinnungsstatus während des simul-tanen Thrombosemodells

Zur Kontrolle des Gerinnungsstatus wurde zu den Zeitpunkten -30, 0, 90 und 180 min Blut entnommen. **A-C:** Die aPTT, FXIIa-Aktivität und PT wurden automatisiert ausgewertet (BCS XP® System, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, DE). **A:** APTT in sec. **B:** FXIIa-Aktivität, relativ zu SHP. **C:** PT in sec. **Grafik D:** Whole Blood Clotting Time in min. Das Vollblut wurde unmittelbar während des Versuchs in vitro gemessen. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM aufgetragen. Die horizontal gestrichelte Linie in Grafik **A** zeigt die maximale Messzeit im Versuch an; die vertikal gestrichelten Linien (**A-D**) markieren den Zeitpunkt 0 min (unmittelbar nach der Substanz-Applikation). SHP: Standard-Humanplasma. Schwarz: Saline / Orange: Anti-FXIIa MAb 3F7.

Die Verlängerung der WBCT hielt in der FXIIa-INH-Gruppe bis zum Ende der Beobachtungszeit von $t=180$ min an: $8,95 \pm 1,48$ min (anti-FXIIa MAb 3F7) versus $3,36 \pm 0,47$ min (Saline). Zwar sank der Wert der WBCT in der FXIIa-INH-Gruppe zum Versuchsende hin wieder, was aber durch eine Eliminierung oder die Verteilung der Substanz in die physiologischen Kompartimente erklärt werden kann. Die Ergebnisse der simultanen Thrombosestudie im Kaninchen deuten darauf hin, dass anti-FXIIa MAb 3F7 unter arteriellen Flussbedingungen einen wirksamen Schutz vor einer chemisch induzierten Thrombose bietet. Im Gegensatz dazu war die Thrombusbildung nach venöser Stase im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Die Messung der physiologischen Hämostase zeigte, dass sowohl in der Ohrblutungszeit als auch im Nierenblutungsversuch unter FXIIa-Inhibition keine Beeinträchtigung der hämostatischen Kapazität vorlag.

4.2.2 Arteriovenöses Shunt-Modell im Kaninchen

In Analogie zu den murinen Thrombosemodellen wurde das A/V Shunt-Modell auch im Kaninchen eingesetzt, um die Wirksamkeit der FXIIa-Inhibition eingehender im nicht-Nagetier-Modell zu untersuchen. Die im Folgenden beschriebene Studie erweitert die Erkenntnisse aus dem murinen A/V Shunt-Modell (Kap. 4.1.3).

Hier wurde die antithrombotische Wirksamkeit des anti-FXIIa MAb 3F7 durch dieses Fremdoberflächen-induzierte Thrombosemodell untersucht. Dabei diente auch hier ein Glaselement als Thrombose-einleitender Reiz. Als Positivkontrolle erhielten die Tiere isotonische Saline ($n = 3$), die Negativkontrollgruppe wurde mit 300 U/kg heparinisiert ($n = 3$), die FXIIa-INH Gruppe wurde mit 7 mg/kg anti-FXIIa MAb 3F7 behandelt ($n = 3$). Im Gegensatz zum Mausmodell wurde hier der A/V Shunt mit Glaselement jedoch im Halsbereich zwischen der *A. carotis externa sinistra* und der *V. jugularis externa* durchgeführt. Der Blutfluss durch den A/V Shunt mit zwischengeschaltetem Glaselement wurde für 60 min beobachtet. Die Tiere wurden 10 min vor Öffnung des A/V Shunts prophylaktisch mit den jeweiligen Testsubstanzen behandelt. Der A/V Shunt wurde mit isotonischer Saline vorbegefüllt. Wie im murinen Modell wurde die Blutflussrate mittels Ultraschallsonde detektiert, hier jedoch direkt an der *V. jugularis externa dextra*. Zusätzlich konnte die hämostatische Kapazität über den Ohrblutungstest und den Nierenblutungstest *in vivo* überprüft werden. Die effektive FXIIa-Hemmung wurde mittels Zitratplasma zu verschiedenen Zeitpunkten *in vitro* kontrolliert, wofür die aPTT, PT und FXIIa-Aktivität bestimmt wurde.

Resultate

Alle Tiere der Positivkontrolle (3/3) entwickelten einen stabil okkludierenden Thrombus, der nach $10,53 \pm 0,46$ min die Blutzirkulation durch den A/V Shunt beendete. Wie erwartet waren alle mit Heparin behandelten Tiere vollständig vor einer Glas-induzierten thrombotischen Okklusion geschützt. Vergleichbar dazu wurde auch in der anti-FXIIa MAb 3F7-Gruppe eine gleichbleibende Blutflussrate ohne eine thrombotische Okklusion über die Beobachtungsdauer von 60 min beobachtet (Abbildung 24 A). Bei 2 von den 3 untersuchten Tieren konnte auch nach Versuchsende kein thrombotisches Material aus dem Glaselement isoliert werden. Ein Tier entwickelte jedoch einen geringfügigen, nicht okklusiven Thrombus in dem Glaselement mit einem Nassgewicht von 2,0 mg. Im Vergleich dazu betrug das Thrombus-Nassgewicht der Saline-Gruppe $126,2 \pm 22,92$ mg.

Bei der Analyse des hämostatischen Status zeigten die heparinisierten Tiere eine deutlich erhöhte Blutungsneigung, was im deutlichen Kontrast zu den mit anti-FXIIa MAb 3F7 - und den Saline-behandelten Tieren stand. Die Werte der FXIIa-INH Gruppe waren sowohl im Ohrblutungstest als auch dem Nierenblutungstest im Einklang mit denen der Saline-Gruppe. Die statistische Analyse der Ohrblutungstests 60 min nach Applikation ergab mittels t-Test im Vergleich von Saline- mit der FXIIa-INH-Gruppe $p = 1$ (Abbildung 24 C). Konsistent dazu wurde für die Nierenblutungszeit ein Wert von $p = 0,765$ und für das Nierenblutungsvolumen $p = 0,8166$ mittels Mann-Whitney Test ermittelt (Abbildung 24 D und E). Daraus wird ersichtlich, dass die hämostatische Kapazität in der anti-FXIIa MAb 3F7-Gruppe in diesen Tests vergleichbar mit der der Saline-Gruppe ist.

Gleichzeitig konnte über die Labortests die erfolgreiche FXIIa-Hemmung über eine verlängerte aPTT (Abbildung 24 F) und eine deutlich verringerte FXIIa-Aktivität bestätigt werden (Abbildung 24 G). Des Weiteren wurde eine unveränderte PT beobachtet (Abbildung 24 H).

Der protektive Effekt von anti-FXIIa MAb 3F7 in diesem nicht-Nager-Modell der Fremdoberflächen-induzierten Thrombose konnte in dieser Studie eindeutig demonstriert werden. In Übereinstimmung mit den makroskopischen Beobachtungen der murinen Modelle konnte in der vorliegenden Studie im Kaninchen eine Beeinträchtigung der physiologischen Hämostase durch die hier angewendeten Untersuchungsmethoden ausgeschlossen werden.

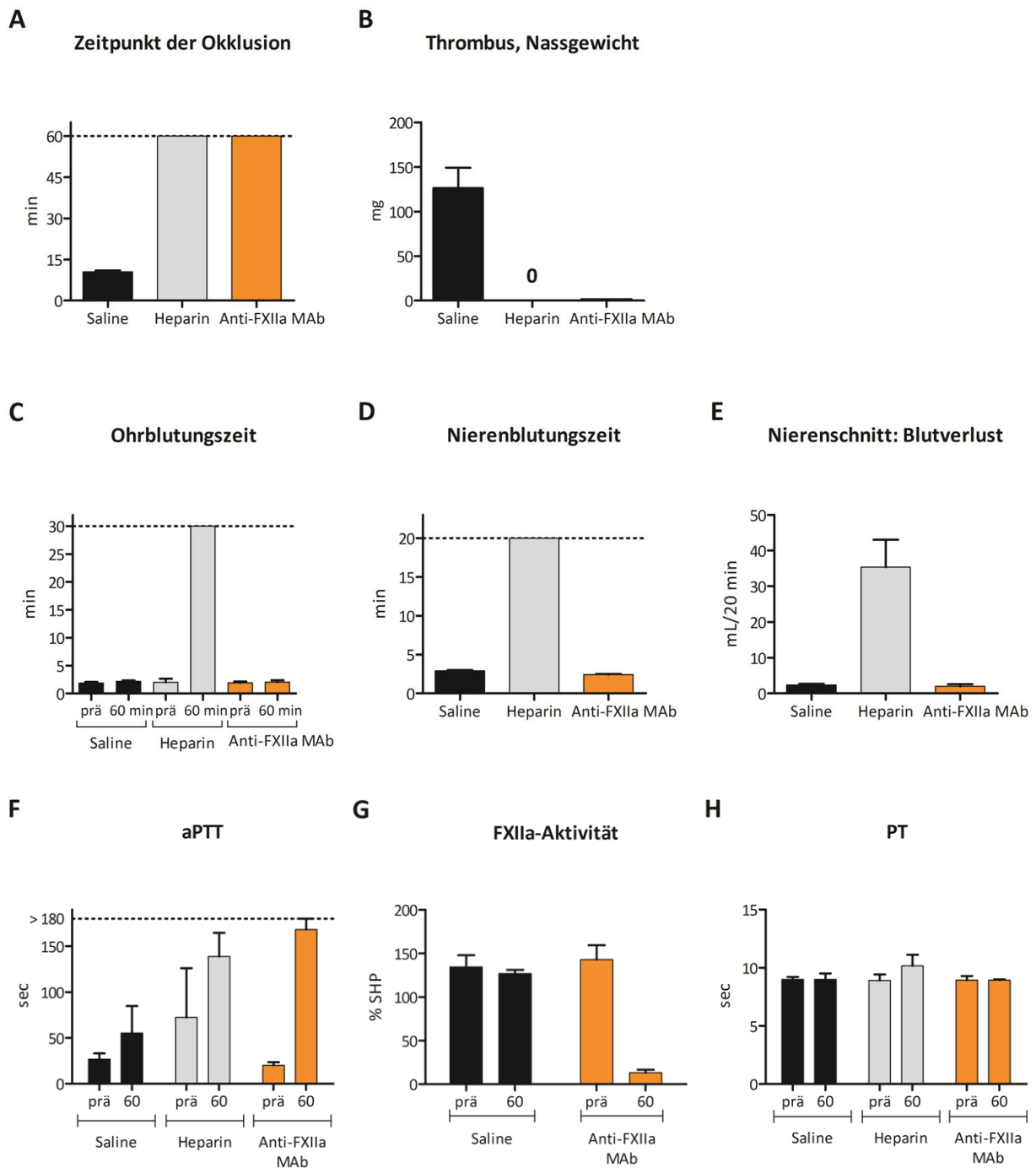


Abbildung 24: Wirksamkeit des anti-FXIIa MAb 3F7 im A/V Shunt-Modell Kaninchen

Zur Evaluierung der antithrombotische Wirkung von anti-FXIIa MAb 3F7 wurde ein Modell der Fremdoberflächen-induzierten Thrombose im Kaninchen gewählt. Dafür wurde ein Katheter mit eingebautem Glaselement als Shunt zwischen A. carotis sinistra und V. jugularis dextra verwendet. Das Glaselement stellte die prokoagulante Oberfläche dar. Die Blutflussrate wurde mittels Ultraschallsonde für

60 min aufgezeichnet. Die Versuchsgruppen ($n = 3$) erhielten randomisiert prophylaktisch Saline, Heparin oder anti-FXIIa MAb 3F7 (7 mg/kg). **A:** Zeitpunkt der Okklusion in min. Bei Ausbleiben der Okklusion wurde der Wert 60 min eingetragen. **B:** Gewicht des aus dem Glaselement entfernten Thrombus nach Versuchsende (60 min) in mg. **C:** Ohrblutungstest; Durchführung vor der Substanzapplikation (prä) und zu Versuchsende (60 min). Die Zeit bis zur Hämostase wurde für längstens 30 min beobachtet. Die Daten sind in min angegeben. T-Test für verbundene Stichproben (Wilcoxon), $p = 1$. **D und E:** Nierenblutungstest; Durchführung im Anschluss an den Versuch der Blutflussmessung. Die Zeit bis zur Hämostase wurde für 20 min beobachtet. Mann-Whitney Test, $p = 0,765$ (D). Außerdem wurde das Volumen der ausgetretenen Blutmenge bestimmt. Mann-Whitney Test, $p = 0,8166$ (Grafik E). **F-H:** Die Plasmaproben wurden vor der Substanzapplikation (0 min) und zu Versuchsende (60 min) entnommen. Es wurde die aPTT (E), die FXIIa-Aktivität (F) und die PT (G) bestimmt. **A-C+F:** Die gestrichelte Linie im Diagramm kennzeichnet das Ende der jeweiligen Beobachtungszeit. **A-G:** Die Daten sind als Mittelwert + SEM aufgetragen. Schwarz: Saline / Grau: Heparin / Orange: Anti-FXIIa MAb 3F7 (7 mg/kg). SHP: Standard Humanplasma

4.2.3 Der Clot-Retraktionstest

Dieser *in vitro*-Test wurde durchgeführt, um den Effekt der FXIIa-Inhibitoren auf die koagulative Plättchenfunktion in den Prozessen der Gerinnselementstehung und -retraktion zu überprüfen. Das Wort „Clot“ bezeichnet in diesem Versuch das artifizielle Gerinnsel aus Plättchen und Serumbestandteilen. Für den Test wurde PRP aus 4 CHB-Kaninchen hergestellt und auf eine einheitliche Plättchen-Konzentration gebracht. Das PRP wurde dann mit den Test- oder Kontrollsubstanzen in gleichem Endvolumen gemischt. Für die Positivkontrolle wurde isotonische Saline und zur Negativkontrolle Heparin eingesetzt. Als FXIIa-INH wurden rHA-Infestin-4 und anti-FXIIa MAb 3F7 mit PRP gemischt. Mittels Kalziumchlorid wurde das Natriumzitrat antagonisiert und durch die Zugabe von Thrombin die Aggregation der Plättchen induziert. Über die Dauer von 180 min wurde der danach eintretende Retraktionsprozess des Clots alle 30 min per digitale Fotografie dokumentiert. Nach Ablauf der Beobachtungszeit wurden das freie Serumvolumen und das Nassgewicht des Clots bestimmt.

In 25 A sind repräsentative Fotos einer Dokumentationsreihe zusammengestellt. Wie erwartet verhinderte Heparin in der Dosierung 9,09 U/mL die durch Thrombin ausgelöste Plättchen-Aggregation und Gerinnung. Daher war über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Clotbildung detektierbar. In der Saline-Probe war schon 30 min nach Thrombinzugabe deutlich eine beginnende Clotbildung zu erkennen. Bei 120 min war eine Retraktion des Clots zu beobachten, wobei sich das Serum klar vom Clot abtrennte. Die Retraktion setzte sich bis 180 min fort. Aus Vorversuchen war bekannt, dass die Retraktion nach 180 min abgeschlossen war. Um einen potenziellen Effekt auf die Plättchenvermittelte Thrombose durch eine spezifische FXIIa-Inhibition zu untersuchen, wurden außerdem die

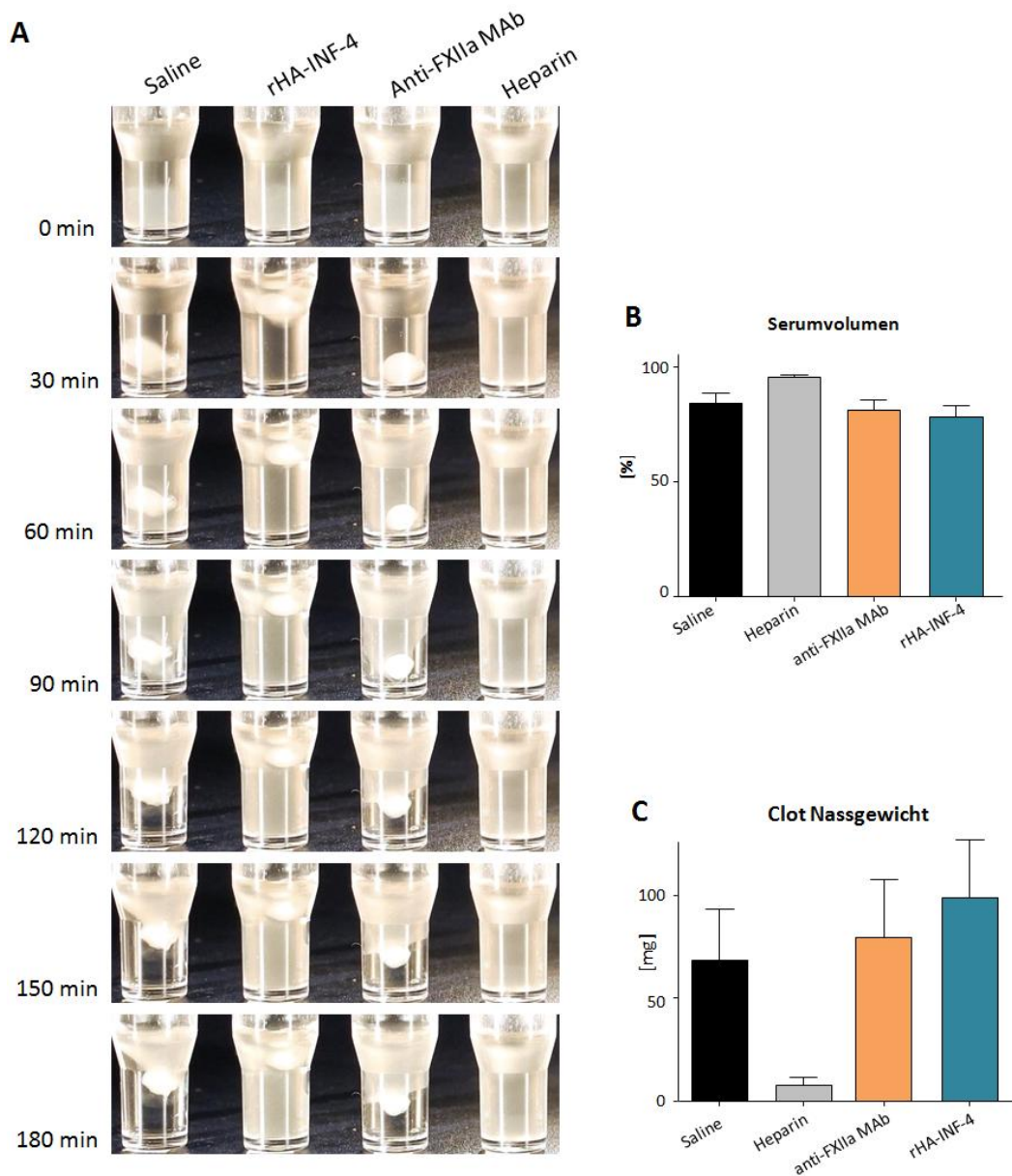


Abbildung 25: Resultate des Clot-Retraktions-Tests

Einfluss der FXIIa-Inhibitoren auf die Entwicklung und Retraktion eines Thrombus auf Ebene der Plättchen-Funktion. Es wurde durch Zugabe von Thrombin in PRP mit einer definierten Plättchenzahl eine Plättchen-Aktivierung und Koagulation eingeleitet. Über 180 min wurde der Prozess fotografisch dokumentiert. **Abbildung A:** Repräsentative Fotostrecke. Von links nach rechts wurden in die Küvetten zum PRP die Substanzen isotonische Saline, rHA-Infestin-4 (3,03 mg/mL), anti-FXIIa MAb 3F7 (0,21 mg/mL) und Heparin (9,09 U/mL) dazugegeben. **B:** Prozentuales Serumvolumen, relativ zum Ausgangsgewicht nach 180 min entnommen. **C:** Nassgewicht des Clots in mg nach 180 min. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SEM. Schwarz: Saline / Grau: Heparin / Orange: Anti-FXIIa MAb 3F7 / Blau: rHA-Infestin-4

Abkürzungen: rHA-INF-4: rHA-Infestin-4

Substanzen rHA-Infestin-4 und anti-FXIIa MAb 3F7 in diesem Versuch untersucht. Die mit rHA-Infestin-4 (3,03 mg/mL) behandelte Probe zeigte bei 30 min im oberen Bereich der Küvette einen Clot. Das umgebende PRP gerann ebenfalls, setzte sich jedoch im Zeitverlauf nicht so eindeutig vom Serum ab, wie in der Positivkontrolle mit Saline. Diese Beobachtung wiederholte sich auch in anderen Versuchsdurchläufen unter Zugabe von rHA-Infestin-4. Die Behandlung von PRP mit anti-FXIIa MAb 3F7 (0,21 mg/mL) zeigte auch bei 30 min eine Clotentwicklung. Zum Zeitpunkt 120 min war deutlich die Retraktion durch die Abgrenzung vom klaren Serum zu beobachten. Die Retraktion der Probe schien zu diesem Zeitpunkt vollständig zu sein, da sich visuell beim nächsten Foto kein Unterschied zeigte.

Um die Clotentwicklung genauer zu untersuchen, wurde das residuale Serumvolumen nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes bestimmt (Abbildung 25 B). In der Positivkontrolle konnten $84,17 \pm 4,4$ % des initial eingesetzten Volumens aus der Küvette entnommen werden. Für Heparin betrug das residuale Serumvolumen im Mittel $95,32 \pm 1,0$ %. Die Daten der FXIIa-INH behandelten Gruppen verhielten sich vergleichbar zur Positivkontrolle mit gemittelt $78,26 \pm 4,7$ % für rHA-Infestin-4 und $81,24 \pm 4,4$ % für anti-FXIIa MAb 3F7.

Zusätzlich wurde nach der Serumentnahme das Nassgewicht des Clots bestimmt. In der Positivkontrolle wog der Clot durchschnittlich $68,24 \pm 24,9$ mg. Wie erwartet wurde in der Heparin-Gruppe kein Clot beobachtet und die $7,97 \pm 3,72$ mg wurden vermutlich durch einen Rest PRP in der Küvette verursacht. Bei rHA-Infestin-4 konnte ein durchschnittliches Clotgewicht von $98,76 \pm 28,33$ mg und bei anti-FXIIa MAb 3F7 $79,69 \pm 27,89$ mg ermittelt werden (Abbildung 25 C).

Die Ergebnisse zeigen, dass die FXIIa-INH unter den gewählten Bedingungen sehr wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Plättchen-vermittelte Clotentwicklung und -Retraktionsfähigkeit zum Zeitpunkt 180 min ausüben.

4.2.4 Erkenntnisse aus den Thrombosestudien im Kaninchen

In den oben beschriebenen Studien wurde der Einfluss von FXIIa-INH auf eine artifizielle Thrombose unter drei verschiedenen Bedingungen im Kaninchen-Modell überprüft. Unter arteriellen Flussbedingungen konnte durch die Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 ein profunder Schutz vor einer FeCl₃-induzierten Thrombose im Kaninchen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte entgegen der Erwartung keine Verbesserung durch FXIIa-INH bei einer durch venöse Stase herbeigeführten Thrombose im Kaninchen beobachtet werden. Die Überprüfung der hämostatischen Kapazität über

die Ohrblutungszeit und den Nierenblutungstest in den Kaninchen-Studien ergaben keine Einschränkung der physiologischen Hämostase unter einer FXIIa-INH-vermittelten Antithrombose, obwohl FXIIa nachweislich inhibiert worden war (Blut- und Plasmatests). Zusätzlich wurde kein Effekt durch anti-FXIIa MAb 3F7 und rHA-Infestin-4 im Vergleich zur Saline-Gruppe auf die Clot-Retraktion *in vitro* gefunden. Dahingegen bestand ein profunder Schutz durch die FXIIa-Inhibition im AV Shuntmodell.

4.3 Wirksamkeit der FXIIa-Inhibitoren im murinen Schlaganfallmodell

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der FXIIa-Inhibition im murinen Schlaganfallmodell dargestellt. Das experimentelle Schlaganfallmodell mit Reperfusion zeichnet sich durch komplexe thrombo-inflammatorische Prozesse aus, die durch eine Ischämie eingeleitet werden. In diesem Zuge treibt FXII(a) vermutlich die Entstehung von Mikrothromben voran. Derzeit ist trotz intensiver Forschungsarbeit die einzige zugelassene Therapieoption eines ischämischen Schlaganfalls die Thrombolysse mittels rt-PA, die gleichzeitig mit ernstzunehmenden Risiken verbunden ist. Mit einer Hemmung von FXIIa im Schlaganfallmodell besteht die Möglichkeit, sowohl thrombotische als auch inflammatorische Aspekte der Reperfusionsschäden zu verhindern. Letztendlich hat dies zum Ziel eine Verbesserung der klinischen Defizite zu erreichen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, das neuroprotektive Potenzial einer FXIIa-Inhibition im murinen experimentellen Schlaganfall zu evaluieren.

Zusammenfassung der publizierten Vorarbeiten

In Vorarbeiten konnte in FXII-defizienten Mäusen im murinen Schlaganfallmodell ein deutlich reduziertes Infarktvolume demonstriert werden [Kleinschnitz C et al. 2006]. Gleichzeitig ergaben neurologische Funktionalitätstests eine signifikante Verbesserung im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen. Kleinschnitz et al. konnten den Befund durch einen prophylaktischen Behandlungsansatz mit dem unspezifischen FXII-Hemmstoff PCK bestätigen und außerdem den Phänotyp eines Kontrolltieres durch Substitution eines FXII-defizienten Tieres mit humanem FXII wiederherstellen [Kleinschnitz C et al. 2006]. Daher wurde postuliert, dass durch die Abwesenheit von FXII im Plasma die neuroprotektiven Eigenschaften hervorgerufen werden. Des Weiteren konnte auf diese Weise die spezieübergreifende Wirkungsweise des humanen FXII in Mäusen demonstriert werden. In einem nächsten Schritt wurde durch die pharmakologische FXIIa-Inhibition mittels rHA-Infestin-4 protektiver Effekt neben verschiedenen Modellen der arteriellen Thrombose auch in einem prophylaktischen Behandlungsansatz im murinen Schlaganfallmodell beobachtet werden [Hagedorn I et al. 2010].

Das experimentelle Schlaganfallmodell in der Maus

Im Einklang mit den oben beschriebenen Vorarbeiten wurde auch in dieser Arbeit das Modell der transienten Okklusion der *A. cerebri media* (tMCAO) zur Induzierung eines ischämischen Schlaganfalls in C57/Bl6 Mäusen angewandt. Dazu wurde ein Faden über die *A. carotis* in die hirnversorgende Zirkulation vorgeschoben, um in den Versorgungsgebieten der *A. cerebri media* eine Ischämie zu erzeugen. Für die Reperfusion wurde der Faden nach 60 min wieder aus dem Gefäß entfernt. Diese artifizielle Rekanalisation verursacht nachfolgend die typischen Prozesse, die auch aus Patienten mit akutem ischämischen Infarkt beschrieben sind: Zellen des Immunsystems überwinden die gestörte BHS und Reperfusionsschäden werden unter anderem durch thrombotische Reaktionen vorangetrieben [del Zoppo GJ et al. 2003; Pham M et al. 2010].

Hintergrund für die vorliegende Arbeit waren die oben beschriebenen vielversprechenden Resultate aus den murinen Schlaganfall-Experimenten unter FXII-Defizienz. Im Rahmen dieser Arbeit ergab sich die Frage, ob eine spezifische FXIIa-Inhibition mit rHA-Infestin-4 auch in einem therapeutischen Behandlungsschema den erwünschten protektiven Effekt zeigen kann. Des Weiteren sollten Wirkungsstudien zum anti-FXIIa MAb 3F7 in einem prophylaktischen Studiendesign durchgeführt werden. Diese präklinischen Untersuchungen stellen den ersten Schritt zur Entwicklung eines neuen Therapieansatzes dar, in dem Schlaganfallpatienten möglicherweise von einer verbesserten Reperfusion durch einen FXIIa-INH profitieren können, ohne sie gleichzeitig einem erhöhte Blutungsrisiko auszusetzen.

4.3.1 Prophylaktische Behandlung mit dem anti-FXIIa MAb 3F7 (10 und 25 mg/kg)

Ziel des Versuches

Ziel dieses Versuches war zunächst die Untersuchung, ob eine Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 im murinen Schlaganfallmodell neuroprotektiv wirkt. Von Hagedorn et al. konnte in einem prophylaktischen Behandlungsansatz mit rHA-Infestin-4 ein deutlich reduziertes Infarktvolumen und eine Verringerung der neurofunktionalen Defizite beobachtet werden [Hagedorn I et al. 2010]. Darauf basierend wurde ebenfalls eine Reduzierung des Infarktvolumens durch Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 im Vergleich zur Positivkontrollgruppe erwartet. Im Falle einer deutlichen Reduzierung des

Infarktvolumens wurde außerdem eine Verbesserung der neurofunktionalen Leistung der Tiere erwartet.

Als spezifischer FXIIa-INH wurde der anti-FXIIa MAb 3F7 in den Dosierungen 10 und 25 mg/kg eingesetzt. Die Applikation erfolgte 15 min vor Einleitung der Ischämie. 24 Stunden nach tMCAO wurden die Versuchsgruppen neurologisch untersucht (Bederson Score und Grip Test). Anschließend wurde unter tiefer Narkose Zitratplasma entnommen und das Hirngewebe für die folgenden Tests (Western Blot und RT-qPCR) präpariert. Die Mäuse wurden randomisiert den 5 Versuchsgruppen zugeteilt, die sich aus naiven Tieren (n = 10) und Sham-operierten (n = 18) zur Negativkontrolle, Saline-behandelte Tiere zur Positivkontrolle (n = 60) und den anti-FXIIa MAb 3F7-behandelten Tieren in den Dosierungen 10 mg/kg (n = 48) bzw. 25 mg/kg (n = 33) zusammensetzten.

Mortalität 24 h nach Einleitung der Ischämie

Zur Evaluierung, ob sich die FXIIa-INH-Behandlung auf die Überlebensrate innerhalb einer Reperusionsperiode von 24 h auswirkt, wurden die Anzahl der verstorbenen Tiere notiert. Wie erwartet überlebten alle Tiere der naiven Gruppe (10/10) und der Sham-operierten Gruppe (18/18). In der Positivkontrollgruppe überlebten 48/60 Tiere und in der mit anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg)-behandelten Gruppe 38/48 die Reperusionsperiode. In der nächst höheren Dosierung des anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) überlebten alle (33/33) die ersten 24 h nach der Ischämie.

Resultate der neurologischen Tests und des zerebralen Infarktvolumens

24 h nach Einleitung der Ischämie wurden die Mäuse dann auf neurofunktionelle Defizite untersucht. Dafür wurde zuerst der Bederson Score durchgeführt, bei dem Punkte von 0 bis 5 vergeben werden, wobei der Punktwert „0“ das bestmögliche und „5“ das schlechtest mögliche Ergebnis für überlebende Tiere darstellten.

Wie erwartet zeigten die Tiere der naiven Gruppe und der Sham-operierten Kontrollgruppe kein auffälliges Verhalten im Bederson Score (0 ± 0 Scorepunkte in beiden Gruppen), da bei diesen Gruppen keine Ischämie durchgeführt worden war (Abbildung 26 A). Im Gegensatz dazu wurde in der Saline-Gruppe ein Mittelwert von $3,3 \pm 0,1$ Punkten erreicht. Das bedeutet, dass die Mehrheit der Versuchstiere (Saline) aufgrund der neuronalen Degeneration im Motorcortex auf der hemiparetischen Seite gegen den Uhrzeigersinn im Kreis lief (Score „3 Punkte“), oder sich unkoordiniert um die eigene Längsachse drehte. Dieses Verhalten deutet auf schwere Störungen in der afferenten Körperwahrnehmung und / oder der motorischen Koordination hin (Score „4 Punkte“).

Im Vergleich dazu wurde in beiden anti-FXIIa MAb 3F7 behandelten Gruppen ein reduziertes neurofunktionelles Defizit beobachtet, das in der Dosierung 10 mg/kg $2,8 \pm 0,2$ Punkte und in der Dosierung 25 mg/kg $2,7 \pm 0,2$ Punkte betrug. Die statistische Analyse mittels Mann-Whitney-Test unter Berücksichtigung der verstorbenen Tiere (S. 87) ergab eine signifikante Differenz zwischen der Saline-Gruppe und der mit 25 mg/kg anti-FXIIa MAb 3F7 behandelten Gruppe mit $p = 0,005$.

Im Anschluss an den Bederson Score wurde der Grip Test mit den Versuchstieren durchgeführt. Der Grip Test erfordert einerseits einen funktionierenden Körper-Orientierungssinn und andererseits die Kraft zur motorischen Ausbalancierung. Aus der Literatur ist bekannt, dass die im Tiermodell beobachteten koordinativen Defizite denen von Schlaganfallpatienten ähneln [Durukan A et al. 2007]. Die Tiere der naiven Gruppe und der Sham-operierten Gruppe erreichten wie erwartet im Durchschnitt die Maximalpunktzahl von „5“ (Abbildung 26 B). Hier lagen keine neurologischen Einschränkungen vor. Verglichen daran zeigte sich die Saline-Gruppe ein deutliches Defizit. Obwohl der Mittelwert bei $2,4 \pm 0,2$ Punkten lag, hatten doch einige Tiere erhebliche Probleme bei der Bewältigung dieser komplexen Aufgabe. Dem gegenüber steht ein kaum veränderter Mittelwert der neuromotorischen Funktion in der anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg)-Gruppe von $2,5 \pm 0,3$ Punkten und ein tendenziell verbesserter Durchschnitt von $2,9 \pm 0,2$ in der anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg)-Gruppe.

Die statistische Analyse unter Berücksichtigung der verstorbenen Tiere mittels Mann-Whitney Test ergab keinen Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit 10 mg/kg behandelten FXIIa-INH-Gruppe. Dahingegen zeigte sich eine signifikante Differenz zwischen der Kontrollgruppe und der mit 25 mg/kg behandelten FXIIa-INH-Gruppe mit $p = 0,0030$ (Mann-Whitney Test). Dies deutet auf eine dosis-abhängige neuroprotektive Wirksamkeit durch die prophylaktische anti-FXIIa MAb 3F7-Behandlung hin.

Im Anschluss an die oben beschriebenen Verhaltenstests wurde die histologische Auswertung des Infarktvolumen (Abbildung 26 C) mithilfe der Vitalfärbung TTC durchgeführt. Dabei wird die klare Lösung TTC durch metabolische Prozesse im vitalen Gewebe zu einem roten Farbstoff umgewandelt. So konnte anhand dreier aufeinanderfolgender Hirnschnitten die weiße Fläche des nekrotischen Infarktkernes bestimmt und hiermit das Infarktvolumen berechnet werden (Kap. 3.5.3). Wie erwartet zeigten sich keine ischämischen Bereiche in den Hirnschnitten der naiven und der Sham-operierten Gruppen. Dagegen war das durchschnittliche Infarktvolumen in der ipsilateralen Hemisphäre der Saline-Gruppe im Mittel $90,69 \pm 7,09 \text{ mm}^3$ groß. Im Unterschied dazu war das Infarktvolumen in der anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg)-Gruppe reduziert auf $67,55 \pm 7,66 \text{ mm}^3$ ($p = 0,7861$; Mann-Whitney

Test). In der anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg)-Gruppe war ein signifikant reduziertes Infarktvolumen von durchschnittlich $81,15 \pm 7,44 \text{ mm}^3$ messbar ($p = 0,0078$; Mann-Whitney Test). Auch hier wurden die verstorbenen Tiere der einzelnen Gruppen bei der Analyse mit berücksichtigt. Die Ergebnisse deuten wiederum auf eine Dosis-unabhängige neuroprotektive Wirksamkeit des anti-FXIIa MAb 3F7 hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die prophylaktische Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) nach einer Reperfusionphase von 24 h im murinen tMCAO-Modell die neurofunktionalen Defizite verbessert und zu einem reduzierten Infarktvolumen führt.

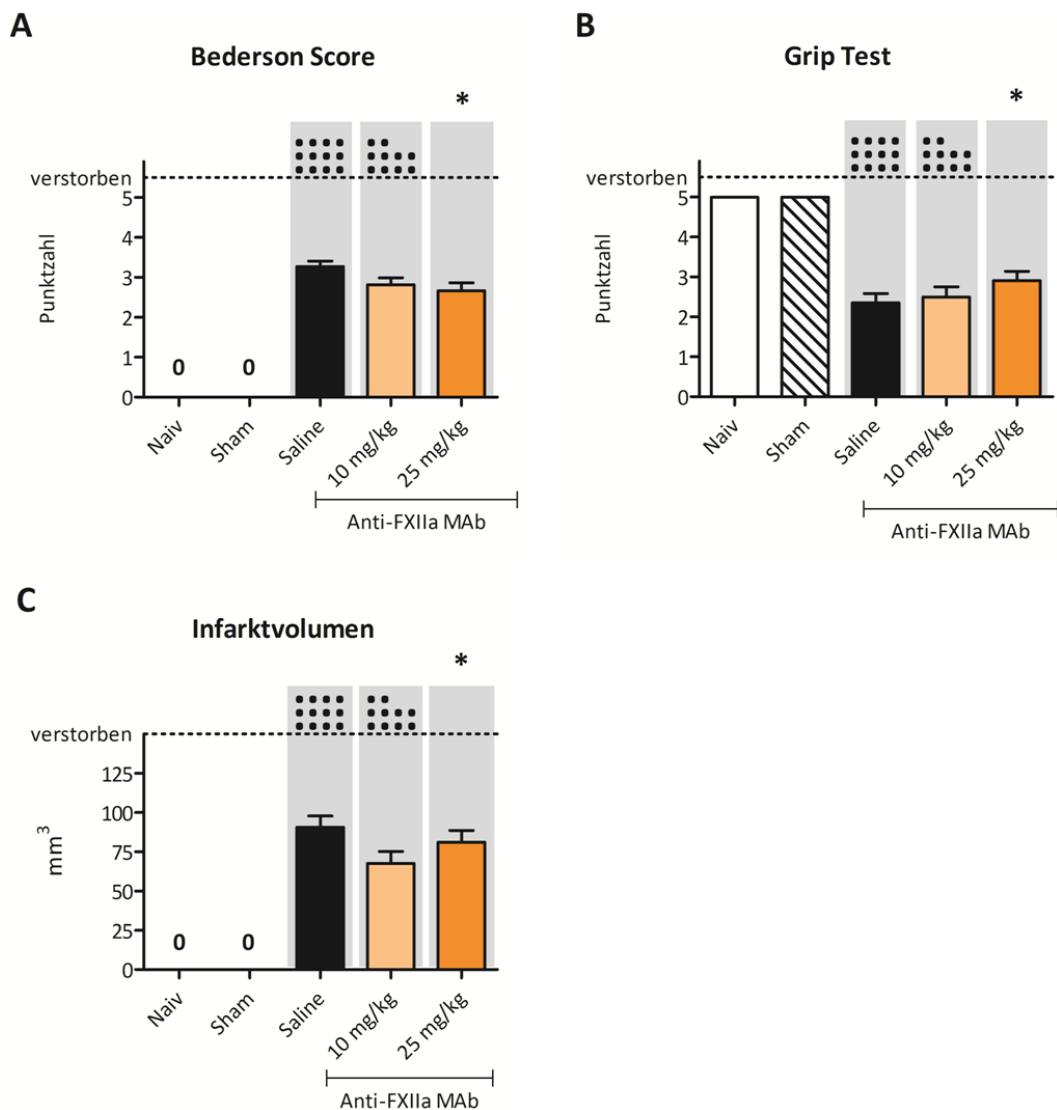


Abbildung 26: Verhaltenstests, Infarkt volumen und Mortalität im murinen tMCAO-Modell nach prophylaktischer Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 (10 und 25 mg/kg)

24 h nach der induzierten Ischämie/Reperfusion wurde die Versuchsgruppen auf neurologische Defizite hin untersucht. Anschließend wurde über die TTC-Vitalfärbung das totale Infarktvolumen berechnet. **A:** Bederson Score. „0 Punkte“ für keine erkennbare Verhaltensänderung steht, und „5 Punkte“ für den Verlust von spontaner Motilität und prämortalem Verhalten. Statistische Analyse für Saline versus anti-FXIIa MAb (25 mg/kg) $p = 0,0005$. **B:** Grip Test. In diesem Test werden „5 Punkte“ für keine neurofunktionalen Defizite vergeben und „0 Punkte“ für neurofunktionale Defizite der Kraft und Koordination. Statistische Analyse für Saline versus anti-FXIIa MAb (25 mg/kg) $p = 0,0030$. **C:** Infarktvolumen, angegeben in mm^3 . Statistische Analyse für Saline versus anti-FXIIa MAb (25 mg/kg) $p = 0,0078$. Alle p -Werte wurden mittels Mann-Whitney Test und unter Berücksichtigung der verstorbenen Tiere ermittelt, was durch die graue Schattierung verdeutlicht wird. Die Diagrammbalken zeigen den Mittelwert \pm SEM. Jeder Punkt oberhalb der gestrichelten Linie kennzeichnet je ein verstorbenes Tier. Weiß: Naiv, $n = 10$ / Grau: Sham-operierte, $n = 18$ / Schwarz: Saline; $n = 48$ / Hell-Orange: Anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg); $n = 38$ / Orange: Anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg); $n = 33$.

Resultate der molekularbiologischen Untersuchung der Hirnschnitte

Im Folgenden werden die Ergebnisse der zerebralen Messungen des Fibrin(-ogen)-Proteingehalts als Indikator für die mikrothrombotischen Prozesse der sekundären Reperfusionsschäden dargestellt. Anschließend wird auf mRNA-Ebene das Expressionsprofil der Ischämie-induzierten Zytokinen IL-1 β , TNF- α und TGF- β eingegangen sowie von Endothelin-1 als Biomarker für die BHS-Integrität.

Relative Proteindichte von Fibrin(-ogen)

Durch eine Reperfusion werden thrombo-inflammatorische Prozesse eingeleitet, die über eine sekundäre Mikrothrombose den wiederhergestellten Blutfluss verhindern und so die Ischämie-induzierte Schädigung weiter vorantreiben (Kap. 1.5.1). Fibrin(-ogen) wurde als Indikator gewählt, um auf Proteinebene zu untersuchen, in wie weit sich die FXIIa-Inhibition auf die Bildung der sekundären Mikrothrombosen auswirkt. Die Messung der Proteindichte wurde in beiden Hemisphären durchgeführt, wobei außerdem zwischen Basalganglien (BG) und Cortex (CX) unterschieden wurde. Dies ist durch das Versorgungsgebiet der *A. cerebri media* begründet, die hauptsächlich die BG versorgt und teilweise auch den motorischen Cortex. Daher liegt der nekrotische Infarktkern im tMCAO-Modell in den BG, während im CX die Penumbra lokalisiert ist. Daher wurden die separierten Gewebe einzeln mittels Western Blot untersucht. Fibrin(-ogen) wurde im Verhältnis zu dem Referenzprotein β -Actin gemessen, daher sind die angegebenen Zahlenwerte in *arbitrary Units* (AU) angegeben.

Die Fibrin(-ogen)-Bestimmung in den ischämischen BG ergab in der naiven Gruppe eine basale Proteindichte von gemittelt $0,363 \pm 0,10$ AU (Abbildung 27 A). In der Sham-operierten Gruppe lag die Fibrin(-ogen)-Dichte nur leicht höher bei gemittelt $0,698 \pm 0,11$ AU. Diese Gruppe war zwar nicht von einer Ischämie betroffen, jedoch könnte schon der mikrochirurgische Eingriff die leichte Erhöhung des Akute-Phase-Proteins Fibrin(-ogen) verursacht haben. Dennoch kann daraus abgeleitet werden, dass die Negativkontrolle valide ist.

Im Gegensatz dazu konnte eine Erhöhung von Fibrin(-ogen) in den ischämischen BG der Saline-Gruppe auf im Mittel $2,945 \pm 0,73$ AU festgestellt werden. Dieser deutliche Anstieg weist darauf hin, dass in der Positivkontrolle vermehrt thrombotische Prozesse ablaufen und diese Gruppe als zuverlässiger Vergleichswert verwendet werden kann.

In der anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) Gruppe wurde ein vergleichbarer Fibrin(-ogen)-Wert von $2,664 \pm 0,51$ AU ermittelt. In der nächst höheren Dosierung des anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) konnte mit einem Mittelwert von $1,418 \pm 0,19$ AU eine signifikante Reduzierung der Fibrin(-ogen)-Dichte beobachtet werden ($p = 0,0012$; Mann-Whitney Test). Für die Analyse aller p-Werte wurde Sterblichkeitsrate mit einbezogen. Die signifikante Reduzierung der Fibrin(-ogen)-Dichte deutet darauf hin, dass die pharmakologische FXIIa-Inhibition einen protektiven Effekt im murinen tMCAO-Modell ausübt.

Im ipsilateralen Cortex (Abbildung 27 B) war für die naive Gruppe ein basaler Mittelwert von $0,433 \pm 0,14$ AU in der relativen Fibrin(-ogen)-Dichte zu beobachten. Die Sham-operierte Gruppe zeigte, vergleichbar zu den Daten aus dem Infarktkern, eine Proteindichte von gemittelt $0,994 \pm 0,12$ AU. Für die Saline-Gruppe wurde ein Anstieg der mittleren Fibrin(-ogen)-Dichte auf $1,878 \pm 0,28$ AU berechnet. Unerwarteter Weise konnte in der anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) Gruppe ein weiterer Anstieg auf $2,472 \pm 0,29$ AU beobachtet werden, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der nächst höheren Dosierung anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) mit $1,811 \pm 0,35$ AU eine Reduzierung der Fibrin(-ogen)-Ablagerung durch Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) beobachtet, die unter Berücksichtigung der verstorbenen Tiere eine signifikante Differenz ergab ($p = 0,0165$; Mann-Whitney Test).

Bei der Analyse der contralateralen Hemisphären (Abbildung 27 C und D) wurde sowohl in den BG als auch im CX generell eine geringere Menge Fibrin(-ogen) als in der ipsilateralen Hemisphäre detektiert. Dennoch gibt es Unterschiede in den Studiengruppen, denn in den BG der Saline-Gruppe wurde eine relative Fibrin(-ogen)-Dichte von $1,195 \pm 0,20$ im Mittel gemessen (Abbildung 27 C). Verglichen mit den ischämischen BG ist dies zwar ein reduzierter Wert, jedoch übertrifft er noch die Fibrin-

(-ogen)-Dichte der Negativ-Kontrollgruppen. Die relative Fibrin(-ogen)-Dichte in der anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) Gruppe wurde mit $1,447 \pm 0,14$ AU berechnet. Im Vergleich dazu wurde in der höheren Dosierung ein Trend zu einer reduzierten Fibrin(-ogen)-Dichte mit gemittelt $1,561 \pm 0,11$ AU beobachtet ($p = 0,0678$; Mann-Whitney Test). Wie erwartet wurde in den BG der naiven Gruppe vergleichbar zur ipsilateralen Auswertung ein Mittelwert von $0,503 \pm 0,09$ AU der relativen Fibrin(-ogen)-Dichte gefunden. Auch in der Sham-operierten Kontrollgruppe ergab sich eine vergleichbare Dichte von gemittelt $0,981 \pm 0,08$ AU.

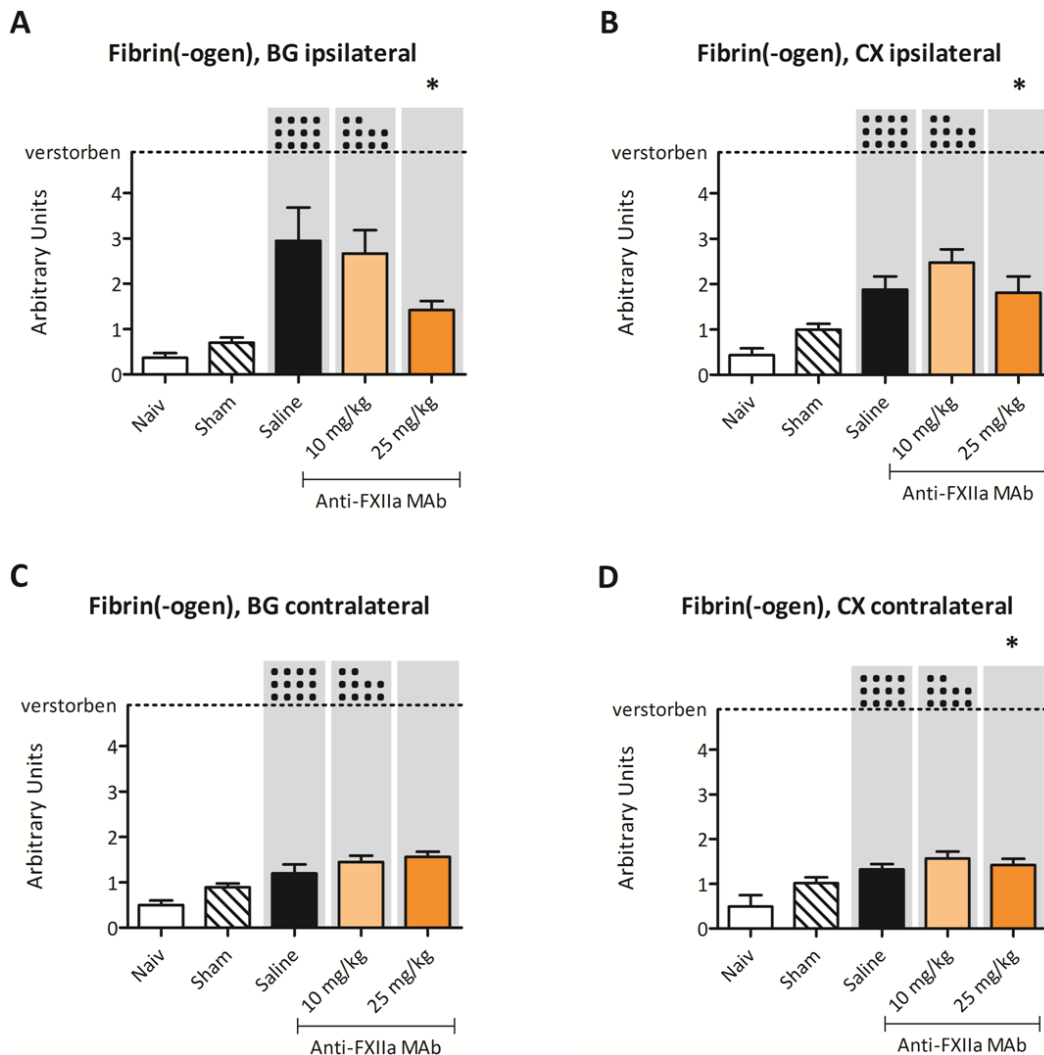


Abbildung 27: Relative Fibrin(-ogen)-Dichte nach zerebraler Ischämie

Nach einer Reperfusionsperiode von 24 h wurde die Fibrin(-ogen)-Dichte in Basalganglien (BG) und Cortex (CX) beider Hemisphären mittels Western Blot bestimmt. Um eine Veränderung der Reperfu-sions-assoziierten Mikrothrombose unter FXIIa-Inhibition zu evaluieren, wurde Fibrin(-ogen) als Bio-

marker gewählt. Die relative Proteindichte von Fibrin(-ogen) ist im Verhältnis zum Referenzgen β -Actin aufgetragen. Der relative Fibrin(-ogen)-Gehalt der ipsilateralen Hemisphäre ist in den Grafiken **A** (BG) und **B** (CX) dargestellt. **A**: Saline versus anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) $p = 0,0012$. **B**: Saline versus anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) $p = 0,0165$. Die Grafiken **C** (BG) und **D** (CX) zeigen die Fibrin(-ogen)-Dichte der contralateralen Hemisphäre. **C**: Saline versus anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) $p = 0,0678$. **D**: Saline versus anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) $p = 0,0430$. Alle p -Werte wurden mittels Mann-Whitney Test und unter Berücksichtigung der verstorbenen Tiere ermittelt, was durch die graue Schattierung verdeutlicht wird. vermittelt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SEM. Jeder Punkt oberhalb der gestrichelten Linie kennzeichnet je ein verstorbenes Tier.

Weiß: Naive; $n = 4$ / Grau: Sham-operierte; $n = 7$ / Schwarz: Saline; $n = 24$ / Hell-Orange: Anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg); $n = 24$ / Orange: Anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) $n = 12$. Abkürzungen: BG - Basalganglien; CX - Cortex.

Dies impliziert, dass die thrombotischen Prozesse nach einer Ischämie zwar hauptsächlich in der betroffenen Hemisphäre ablaufen, aber dennoch auch die contralaterale Hemisphäre beeinflussen, was anhand der mild erhöhten Fibrin(-ogen)-Ablagerung gezeigt werden konnte.

Die Beobachtungen gelten auch für die Analyse der relativen Fibrin(-ogen)-Dichte des contralateralen CX (Abbildung 27 D). Die Bestimmung ergab in der naiven Gruppe eine basale Proteindichte von $0,489 \pm 0,25$ AU und in der Sham-operierten Gruppe $1,014 \pm 0,13$ AU. Im Gegensatz dazu konnte eine Erhöhung von Fibrin(-ogen) in den ischämischen CX der Saline-Gruppe auf im Mittel $1,321 \pm 0,12$ AU festgestellt werden. Wie auch schon in den BG beobachtet, wurde in der anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg)-Gruppe eine vergleichbare Fibrin(-ogen)-Dichte mit gemittelt $1,567 \pm 0,15$ AU ermittelt. Dem gegenüber steht eine signifikant reduzierte Proteindichte in der anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg)-Gruppe mit im Mittel $1,418 \pm 0,14$ AU, ($p = 0,0430$; Mann-Whitney Test). Wie oben für die BG beschrieben, konnte auch im contralateralen CX ein milder Effekt auf die Fibrin(-ogen)-Ablagerung durch die Ischämie der gegenüberliegenden Hemisphäre beobachtet werden.

Relative mRNA-Expression von Biomarkern nach Ischämie

Um die Wirkung einer FXIIa-Inhibition auf die Ischämie-induzierten inflammatorischen Prozesse zu untersuchen, wurden die Expressionsprofile der Zytokine IL-1 β , TNF- α und TGF- β analysiert. Dabei forcieren IL-1 β und TNF- α pro-inflammatorische Prozesse, während TGF- β immunomodulatorisch wirkt. Außerdem wurde die mRNA-Expression von Endothelin-1 (Edn-1) untersucht, da die gesteigerte Edn-1-Expression auf Ischämie-vermittelte Schädigungen der BHS hinweist. Die Fragestellung war hier, in wie weit die Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 einen Effekt auf die Ischämie-induzierte Inflammation hat und ob die FXIIa-Inhibition sich protektiv auf die Integrität der BHS auswirkt. Die

mRNA-Expressionsprofile der ipsilateralen Hemisphären wurden mittels der RT-qPCR-Technik untersucht und anhand der $\Delta\Delta\text{-C}_\text{T}$ -Methode analysiert. Dabei wurde die individuelle Expression des Referenzgens GAP-DH zur Normierung verwendet. Der resultierende Quotient wurde wiederum anhand des Medians aus der Sham-operierten Gruppe kalibriert. Diese Vorgehensweise hat sich etabliert, um im murinen Schlaganfallmodell Veränderungen der mRNA-Expressionsprofile zu analysieren. Des Weiteren wurden auch hier alle p-Werte unter Berücksichtigung der Sterblichkeitsrate und mit dem Mann-Whitney Test berechnet.

Die relative Genexpression des pro-inflammatorischen IL-1 β ergab in den ischämischen BG für die naiven Tiere gemittelt $9,645 \pm 4,42$ AU, für die Sham-Gruppe $1,126 \pm 0,20$ AU, und für die Saline-Gruppe $21,21 \pm 3,68$ AU (Abbildung 28 A). Konträr dazu steht die erhöhte IL- β -Expression der anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) Gruppe mit $39,75 \pm 7,00$ AU ($p = 0,0778$; Mann-Whitney Test). In der nächst-höheren Dosierung des anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) wurde dahingegen eine reduzierte IL-1 β -Expression von $12,07 \pm 1,74$ AU beobachtet, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte ($p = 0,2144$).

Die Auswertung der IL-1 β -Expression im ipsilateralen CX (Abbildung 28 B) ergab für die naiven Tiere einen Mittelwert von $10,67 \pm 3,43$ AU und für die Sham-Gruppe $1,092 \pm 0,139$ AU. Verglichen damit erreichte die Saline-Gruppe eine stark erhöhte mRNA-Expression von $33,56 \pm 4,50$ AU. Dieser Wert wurde durch die IL-1 β -Expression der anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) Gruppe mit $49,46 \pm 14,25$ AU noch übertroffen, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Dem gegenüber steht die signifikant reduzierte mRNA-Expression der nächst höheren Dosierung mit $13,96 \pm 2,10$ AU ($p < 0,0001$).

Das bedeutet, dass eine Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 die Penumbra schützt. Dadurch sind im Umkehrschluss nach der Ischämie jedoch mehr Neurone metabolisch in der Lage IL-1 β freizusetzen, was zu einer Forcierung der inflammatorischen Prozesse beitragen könnte.

Als weiterer Biomarker wurde TNF- α für die Ischämie-vermittelten inflammatorischen Reaktionen analysiert. Das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α vermittelt sowohl neurotoxische Effekte unmittelbar nach einer Ischämie. Die Analyse der TNF- α Expressionsmuster in den ipsilateralen BG (Abbildung 28 C) ergab im Mittel für die naive Gruppe einen basalen Wert von $2,272 \pm 0,10$ AU und in der Sham-operierten $1,079 \pm 0,10$ AU. Verglichen damit wurde für die Saline-Gruppe eine deutliche Hochregulierung der mRNA mit $16,97 \pm 2,56$ AU gezeigt. In den FXIIa-INH-Gruppen wurde eine noch

massivere TNF- α -Expression beobachtet. Der Wert für die anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) Gruppe lag bei $71,91 \pm 21,87$ AU. In der anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) Gruppe wurde eine zusätzlich erhöhte mRNA-Expression von $94,58 \pm 10,53$ AU beobachtet, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte ($p = 0,5832$).

Diese Daten wurden auch im ipsilateralen Cortex bestätigt (Abbildung 28 D). Die basale TNF- α -Expression in der naiven Gruppe betrug gemittelt $1,913 \pm 0,46$ AU und in der Sham-operierten Gruppe $1,445 \pm 0,48$ AU. Wie in den BG konnte auch im ischämischen CX der Saline-Gruppe eine TNF- α Hochregulation detektiert werden, die bei $65,19 \pm 18,09$ AU betrug. Wie zuvor wurde die mRNA-Expression der FXIIa-INH Gruppen noch erheblich übertroffen, denn in der anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) wurde ein Wert von $162,0 \pm 27,95$ AU und in der anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) Gruppe $115,7 \pm 12,08$ AU. Der Vergleich der TNF- α -Expression zwischen Saline versus anti-FXIIa MAb (beide Dosierungen) ergab im CX keinen signifikanten Unterschied. Es ist auch hier möglich, dass die Zellen der geschützten Penumbra in der FXIIa-INH-Gruppe (10 mg/kg) verhältnismäßig mehr TNF- α freisetzen können, als bei einem ausgedehnteren Infarktkern der Positivkontrollgruppe. Allerdings zeigte sich in der nächsthöheren Dosierung des anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) eine mit der Kontrolle vergleichbare TNF- α -Freisetzung.

Des Weiteren wurde das Expressionsmuster von TGF- β untersucht. TGF- β gilt einerseits als immunomodulatorisches Zytokin mit neuroprotektiver Wirkung. Es wird aber andererseits auch mit der Ausbildung von Narbengewebe im ZNS assoziiert. Als Analyse-Parameter im murinen tMCAO-Modell gibt die Expression von TGF- β Auskunft über die Einleitung endogener neuroprotektiver Prozesse und der Bildung von nicht-funktionalem Narbengewebe nach einer Ischämie.

Im Infarktkern der BG erreichten die naiven Tiere durchschnittlich eine relative mRNA-Expression von TGF- β mit $1,127 \pm 0,11$ AU und die Sham-operierten Tiere $1,140 \pm 0,19$ AU (Abbildung 28 E). In der Saline-Gruppe ergab sich eine erhöhte TGF- β -Expression mit $3,340 \pm 0,72$ AU. Ähnlich verhielt sich die mRNA-Expression der anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) Gruppe mit $4,107 \pm 1,08$ AU. Im Gegensatz dazu wurde in der anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) Gruppe eine reduzierte TGF- β -Expression von $1,752 \pm 0,38$ AU detektiert. Die statistische Analyse ergab für den Vergleich zwischen der Positivkontrollgruppe versus der anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) Gruppe in den BG eine signifikant verringerte TGF- β -Freisetzung mit $p = 0,0022$.

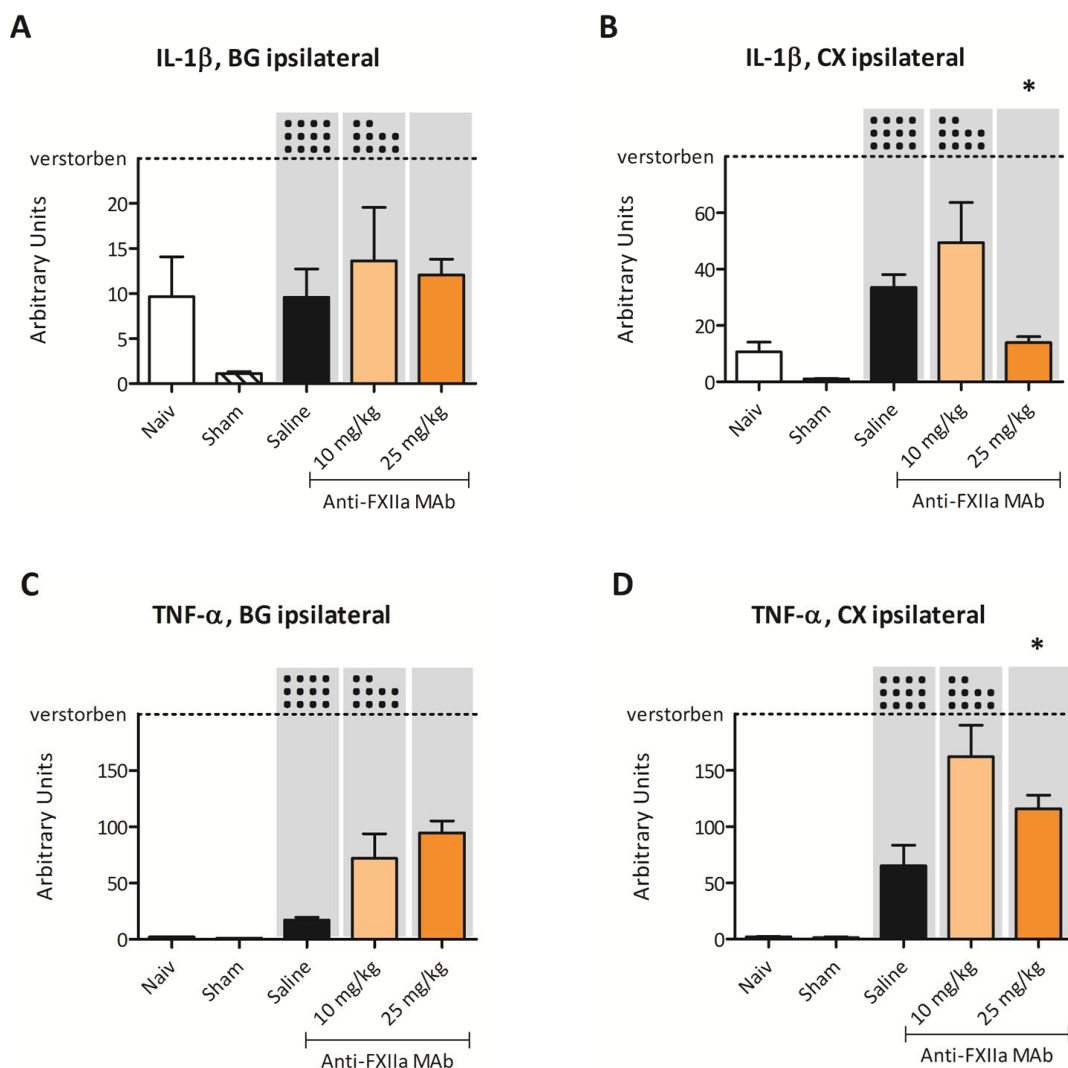
Dieser Befund wurde in der Bewertung der TGF- β mRNA-Expression im ipsilateralen CX bestätigt (Abbildung 28 F). Die basale mRNA-Expression der naiven Gruppe betrug im Mittel $1,312 \pm 0,49$ AU

und in der Sham-operierten Gruppe $2,521 \pm 1,57$ AU. Wie zuvor konnte auch in der Saline-Gruppe eine Hochregulation von TGF- β mRNA mit einem Mittelwert von $10,60 \pm 3,13$ AU festgestellt werden. Im ischämischen CX der anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) Gruppe betrug die deutlich erhöhte mRNA-Expression durchschnittlich $27,76 \pm 11,42$ AU, wohingegen in der anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) Gruppe im Einklang zur reduzierten TGF- β -Expression der BG steht. Denn auch im CX wurde eine nahezu basale TGF- β -Expression von gemittelt $2,269 \pm 0,44$ AU beobachtet. Die statistische Analyse ergab nur in der anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg)-Gruppe eine hoch signifikante Differenz der TGF- β -Freisetzung mit $p < 0,0001$.

Wie schon bei IL-1 β und TNF- α beobachtet wurde, zeigte sich auch bei der Expressionsanalyse von TGF- β unter FXIIa-Inhibition in der niedrigeren Dosierung kein deutlicher Unterschied zur Positivkontrolle im Infarktkerngebiert der BG. Jedoch wurde im CX (Penumbra) ein massiver Anstieg der TGF- β -Expression beobachtet. Wahrscheinlich ist dies ebenfalls darauf zurückzuführen, dass die Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) eine größere Anzahl vitaler Zellen im CX nach einer Ischämie hinterlässt. Diese fördern die Synthese der Ischämie-induzierten Botenstoffe zu denen IL-1 β , TNF- α und TGF- β gehören. Dem steht der Effekt der 25 mg/kg-Behandlung gegenüber, denn hier wurden signifikante Unterschiede zur niedrigeren Dosierung beobachtet, die die erwartete reduzierte Freisetzung von IL-1 β und TGF- β mit sich brachten. Bei der TNF- α wurde hier keine Verbesserung im Vergleich zur Positivkontrolle beobachtet. Zusammen betrachtet unterstützt die Messung der Inflammations-Biomarker also die Annahme, dass die FXIIa-Inhibition neuroprotektiv wirkt.

Außerdem wurde die relative mRNA-Expression von Endothelin-1 (Edn-1) als Indikator für die intakte BHS untersucht. Eine ischämische Phase im ZNS induziert eine Hochregulation von Edn-1. Dies führt letztendlich zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und begünstigt eine Ödembildung. Die naive Gruppe zeigte daher in den ischämischen BG eine sehr niedrige Edn-1 mRNA-Expression von $0,788 \pm 0,11$ AU und in der Sham-operierten Gruppe von $1,140 \pm 0,19$ AU (Abbildung 28 G). In der Saline-Gruppe wurde eine deutliche Erhöhung der mRNA-Expression von $4,931 \pm 0,58$ AU detektiert, was eine Konsequenz der Ischämie darstellt. Die weitere Auswertung ergab in der anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) Gruppe überraschenderweise eine deutlich hochregulierte Edn-1 mRNA-Expression von durchschnittlich $7,479 \pm 3,28$ AU. Im Vergleich dazu ergab sich für die anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) Gruppe eine Edn-1-Expression mit $5,783 \pm 0,81$ AU, die mit dem Wert der Positivkontrolle vergleichbar ist ($p = 0,0689$).

Die Beurteilung der relativen Edn-1 mRNA-Expression im ipsilateralen CX (Abbildung 28 H) bestätigte in der naiven Gruppe mit durchschnittlich $0,754 \pm 0,10$ AU die basalen Werte der BG. Dies traf auch auf die Sham-operierte Gruppe zu, die einen Mittelwert von $1,666 \pm 0,81$ AU aufzeigte. Wie erwartet wurde in der Saline-Gruppe ein massiver Anstieg der Edn-1 mRNA-Expression detektiert mit einem Mittelwert von $146,4 \pm 80,59$ AU. In der anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) Gruppe wurde eine vergleichbare mRNA-Expression mit $93,37 \pm 40,50$ AU beobachtet. In starkem Kontrast hierzu steht die Analyse der anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) Gruppe, deren mRNA-Profil auf eine massive Herunterregulierung der Edn-1 mRNA hindeutet. Durchschnittlich wurde hier eine relative Edn-1-Expression von $0,0166 \pm$



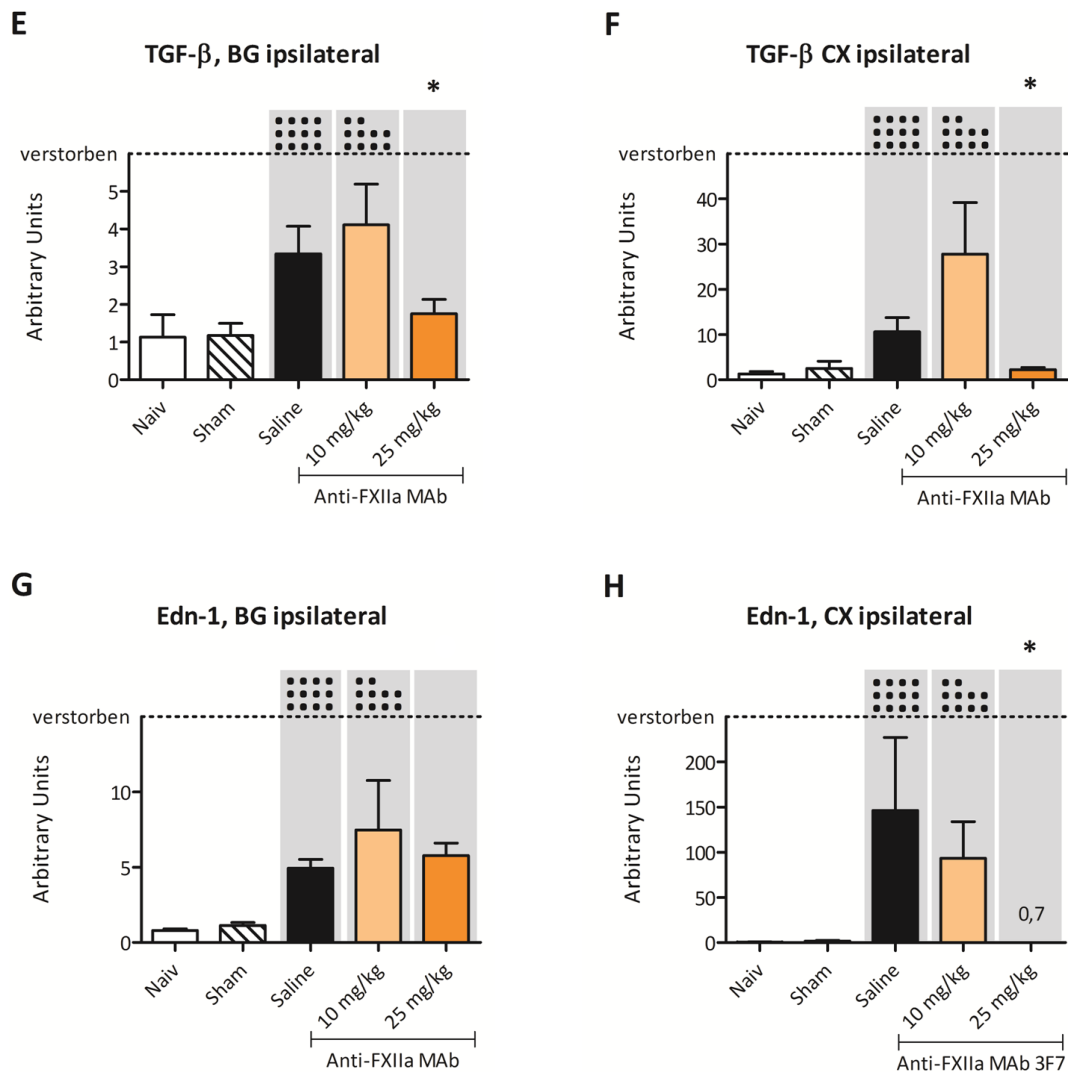


Abbildung 28: Veränderte mRNA-Expressionsprofile nach zerebraler Ischämie

Um das Ausmaß der Ischämie/Reperfusion-induzierten Inflammation zu evaluieren, wurde die mRNA-Expression der Zytokine IL-1 β , TNF- α und TGF- β in den ipsilateralen Hemisphären mittels RT-qPCR bestimmt. Zusätzlich wurde Edn-1 als Biomarker für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke analysiert. Die relative Genexpression wurde nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode anhand eines Kalibrators und des Referenzgens GAP-DH berechnet und in AU angegeben. Die Genexpression des pro-inflammatorischen IL-1 β ist in den Grafiken A (BG) und B (CX) dargestellt. B: Saline vs. anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg); $p < 0,0001$. Die Grafiken C (BG) und D (CX) zeigen die Expression des neuroprotektiven und pro-inflammatorischen Mediators TNF- α . Keine statistisch signifikanten Differenzen. Die relative Expression des immunomodulatorischen TGF- β werden in den Grafiken E (BG) und F (CX) dargestellt. E: Saline vs. anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg); $p = 0,0022$. F: Saline vs. anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg); $p < 0,0001$. Schließlich ist in den Grafiken G (BG) und H (CX) die Expression von Edn-1 als Biomarker für die Integrität der BHS aufgetragen. G: Saline vs. anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) $p = 0,0689$. H: Saline vs. anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) $p < 0,0001$. Alle p -Werte wurden mittels Mann-Whitney Test und unter Berücksichtigung der verstorbenen Tiere ermittelt, was durch die graue Schattierung verdeutlicht

wird. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SEM. Jeder Punkt oberhalb der gestrichelten Linie kennzeichnet je ein verstorbenes Tier. Weiß: Naiv; $n = 5$ / Grau: Sham-operiert; $n = 9$ / Schwarz: Saline; $n = 24$ / Hell-Orange: Anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg); $n = 22$ / Orange: Anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg); $n = 13$. Abkürzungen: BG - Basalganglien; CX - Cortex; Edn-1 - Endothelin-1.

0,0019 AU beobachtet, was eine statistisch signifikante Differenz zwischen Positivkontrolle und anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg)-behandelter Gruppe darstellt ($p < 0,0001$).

Bei der Analyse der Edn-1-mRNA im Infarktkerngebiet (BG) wurde also kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den Gruppen der FXIIa-Inhibition beobachtet. Jedoch zeigte sich in der Penumbra (CX) eine dosisabhängige massive Herunterregulierung von Edn-1 nach FXIIa-INH-Behandlung, die auch das mRNA-Level der Negativkontrollen unterschritt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist ein starker protektiver Effekt durch die FXIIa-Inhibition auf die BHS.

Plasmatests zur FXIIa-Inaktivierung

Zur Überprüfung der FXIIa-Inaktivierung in den Versuchsgruppen wurde den Mäusen im Anschluss an die Verhaltenstests, also 24 h nach der Einleitung der Ischämie, final Blut entnommen. Das mit Zitrat antikoagulierte Plasma wurde automatisiert mit dem BCS® XP auf aPTT, PT und FXIIa-Aktivität getestet.

In der naiven Gruppe ergab die aPTT-Messung normale Werte für C57/Bl6-Mäuse mit $34,71 \pm 1,46$ sec und in der Sham-Gruppe $52,29 \pm 5,44$ sec (Abbildung 29 A). In der mit Saline behandelten Gruppe zeigte sich eine moderate Verlängerung der aPTT ($91,88 \pm 5,06$ sec), die durch den Verbrauch von FXIIa nach der Reperfusion verursacht worden sein kann. Wie erwartet zeigten beide FXIIa-Inhibitor-Gruppen eine markante Verlängerung der aPTT. 22 von 29 Tiere der anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg) Gruppe zeigten keine Koagulation innerhalb der Messdauer von 180 sec. Bei den 7 verbliebenen Tieren wurde ein Mittelwert von $126,0 \pm 10,51$ sec errechnet. In der anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) Gruppe überschritten 10 der 33 Plasmaproben die obere Messgrenze und daher ergab sich bei den 9 verbleibenden durchschnittlich eine aPTT von $141,3 \pm 5,03$ sec.

Die Aktivitätsbestimmung vom plasmatischen FXII diente außerdem zur Kontrolle der erfolgreichen FXIIa-Inhibition. Diese Messdaten sind in Relation zu Standard Humanplasma (SHP) angegeben (Abbildung 29 B). Wie erwartet wurde in der naiven Gruppe ($74,59 \pm 5,77$ % SHP) und der Sham-operierten Gruppe ($64,08 \pm 5,94$ % SHP) die maximale FXII-Aktivität beobachtet. Passend zur moderaten aPTT-Verlängerung war auch die FXIIa-Aktivität der Saline-Gruppe geringfügig reduziert ($48,91 \pm 4,48$ %

SHP). In den anti-FXIIa MAb 3F7-Gruppen wurde die geringste Aktivität beobachtet, wobei die anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg)-Gruppe $16,29 \pm 1,45$ % SHP erreichte. Von 29 Tieren wurde bei 2 die untere Messgrenze (< 5 % SHP) unterschritten, sodass diese Tiere nicht in der Auswertung mit einbegriffen sind. In der mit 25 mg/kg-behandelten Gruppe wurde bei 10 von 33 Tieren die untere Messgrenze unterschritten. Für die verbliebenen 23 Tiere ergab sich im Mittel $12,31 \pm 1,42$ % SHP. Zusätzlich wurde die Funktionalität der extrinsischen Koagulation mittels PT bestimmt. Generell lagen die Messdaten aller Versuchsgruppen in einem Intervall zwischen 7,9 sec bis maximal 14,8 sec (Abbildung 29 C). Im Detail erreichte die naive Gruppe $10,00 \pm 0,22$ sec, die Sham-Gruppe $8,907 \pm 0,08$ sec und die Saline-Gruppe $8,821 \pm 0,13$ sec. Vergleichbar dazu wurde in der niedrigeren FXIIa-INH-Dosierung ein Wert von $9,446 \pm 0,34$ sec und in der höheren Dosierung $8,778 \pm 0,12$ sec gemessen. Dies entspricht dem Normbereich für Mäuse. Es ergab sich keine Veränderung durch die anti-FXIIa MAb 3F7-Behandlung.

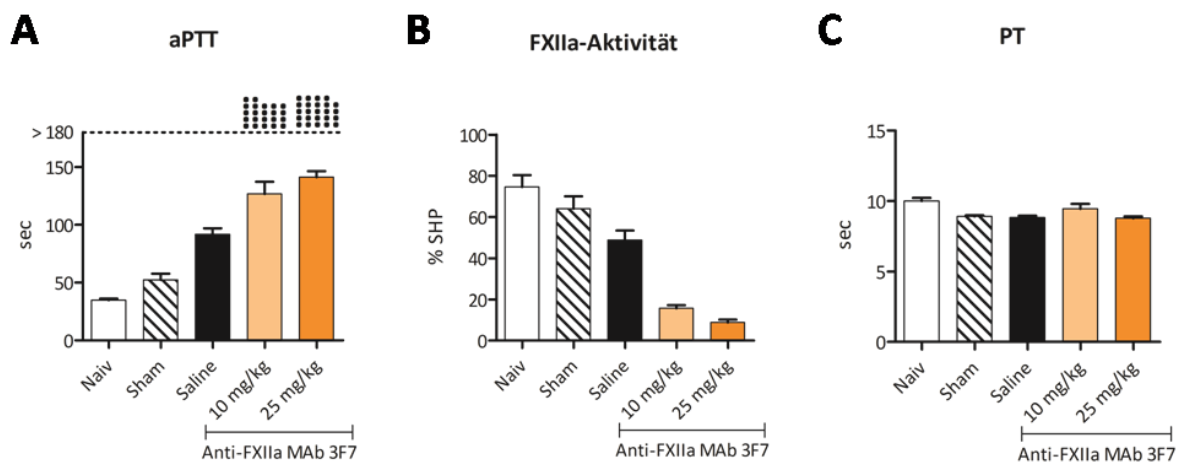


Abbildung 29: Plasmatests zur Evaluierung des Gerinnungsstatus 24 h nach Einleitung der Ischämie

Nach der Reperfusionsdauer von 24 h wurde Plasma zur Evaluierung des Gerinnungsstatus entnommen. **A:** APTT in sec, die durch die intrinsische Gerinnung eingeleitet wird. Jeder Punkt oberhalb der gestrichelten Linie kennzeichnet je eine Probe außerhalb der oberen Messgrenze. **B:** FXIIa-Aktivität, relativ zu SHP. **C:** PT in sec, die die Funktionalität der extrinsischen Koagulation anzeigt. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SEM. Weiß: Naiv; n = 15 / Grau: Sham-operierte; n = 16 / Schwarz: Saline; n = 34 / Hell-Orange: Anti-FXIIa MAb 3F7 (10 mg/kg); n = 29 / Orange: Anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg); n = 33. Abkürzung: SHP - Standard Humanplasma

4.3.2 Prophylaktische Behandlung mit dem anti-FXIIa MAb 3F7 (50 mg/kg)

Ziel des Versuchs

In den vorhergehenden Studien wurden initiale Hinweise auf eine protektive Wirksamkeit durch anti-FXIIa MAb 3F7 in dem murinen Schlaganfallmodell gefunden. Daher war das nächste Ziel diesen Effekt durch eine erhöhte Dosis von anti-FXIIa MAb 3F7 mit 50 mg/kg deutlicher heraus zu arbeiten. Das Studiendesign wurde wie in 4.3.2 beschrieben beibehalten. Der anti-FXIIa MAb 3F7 wurde 15 min vor Beginn der ischämischen Phase i.v. in der Dosierung 50 mg/kg appliziert. 24 h nach tMCAO-induzierter Ischämie wurden die Versuchsgruppen neurologisch untersucht (Bederson Score und Grip Test). Anschließend wurde unter tiefer Narkose Zitratplasma entnommen und das Gehirngewebe für die Infarkt volumetrie mittels TTC-Vitalfärbung präpariert. Aufgrund der einheitlichen Datenlage in der naiven Gruppe aus Kap. 4.3.1 und aus tierschutzrechtlichen Gründen wurde in dieser Teilstudie auf die naive Gruppe verzichtet. Folgende Gruppen wurden untersucht: Sham (n = 4), Saline (n = 9) und anti-FXIIa MAb 3F7 (50 mg/kg; n = 9).

Mortalität 24 h nach Einleitung der Ischämie

Wie erwartet überlebten alle Tiere Sham-operierten Gruppe (4/4). In der Positivkontrollgruppe überlebten 7/9 Tieren und in der mit anti-FXIIa MAb 3F7 (50 mg/kg)-behandelten Gruppe 7/9 die Reperusionsperiode. In beiden Gruppen musste jedoch ein Tier aus der Auswertung entfernt werden, weil über die TTC-Färbung und die Verhaltenstests kein Infarkt bzw. neurologischer Defizit nachweisbar war. Makroskopisch war während der Operation keine erhöhte Blutungsneigung oder eine vermehrte ICH beobachtet worden.

Resultate der neurologischen Tests und des Infarktvolumens

Die Verhaltenstests zur Evaluierung der neurologischen Defizite wurden 24 h nach Einleitung der Ischämie durchgeführt. Im Einklang mit der vorherigen Studie schnitt die Sham-operierte Kontrollgruppe im globalen Bederson Test mit voller Punktzahl ab, denn es waren keine neurologischen Defizite zu beobachten (Abbildung 30 A). In der Saline-Gruppe wurde ein Durchschnitt von $2,8 \pm 0,2$ Punkten erreicht und die FXIIa-INH Gruppe zeigte mit einer mittleren Punktzahl von $3,0 \pm 0,36$ keine signifikante Verbesserung der neurologischen Defizite.

Die Evaluierung des Grip Tests ergab wie zuvor in der Sham-operierten Kontrollgruppe kein Hinweis auf eine neurofunktionale Beeinträchtigung, denn alle Tiere wurden mit 5 Punkten bewertet (Abbil-

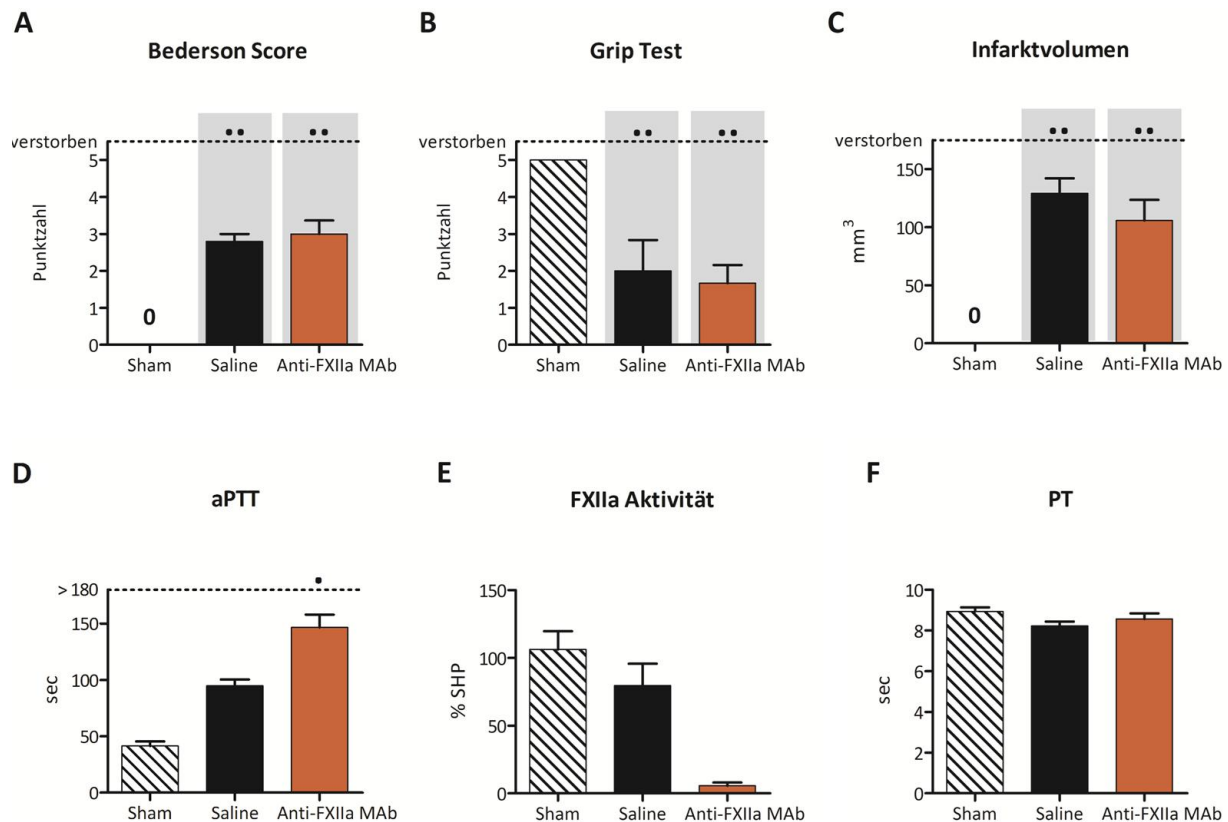


Abbildung 30: Wirksamkeit des anti-FXIIa MAb 3F7 (50 mg/kg) in der zerebralen Ischämie

24 h nach der Reperfusion wurden die neurologischen Defizite evaluiert und anschließend das Infarktvolumen mittels TTC-Vitalfärbung bestimmt. Zusätzlich wurden Plasmatests zur Bestimmung des Gerinnungsstatus untersucht. **A:** Bederson Score. „0“ steht für keine erkennbare Verhaltensänderung, und „5“ Punkte für den Verlust von spontaner Motilität und prämortalem Verhalten. **B:** Grip Test. In diesem Test wird eine „5“ für keine neurofunktionalen Defizite vergeben. Dahingegen zeigt die „0“ ein Defizit der motorischen und koordinativen Koordination an. Die statistische Analyse wurde mit dem Mann-Whitney Test unter Berücksichtigung der verstorbenen Tiere durchgeführt, was durch die graue Schattierung verdeutlicht wird. **C:** Das Volumen des Infarktes ist in mm³. **D - F:** Resultate der Plasmatests. Dabei dient die aPTT (**D**) als Nachweis für die Fremdoberflächen-induzierte Koagulation. Die Evaluation der FXIIa-Aktivität (**E**) diente zur Überprüfung der effektiven FXIIa-Inhibition. Die PT (**F**) zeigt die Funktionalität der extrinsischen Koagulation an. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SEM. Jeder Punkt oberhalb der gestrichelten Linie kennzeichnet je ein verstorbenes Tier. Grau: Sham-operierte; n = 4 / Schwarz: Saline; n = 6 / Dunkel-Orange: Anti-FXIIa MAb 3F7 (50 mg/kg); n = 6. Abkürzungen: SHP - Standard Humanplasma.

dung 29 B). Dem gegenüber stehen die Daten der Saline-Gruppe, in der durchschnittlich $2,0 \pm 0,83$ Punkte erreicht wurden. Unerwarteter Weise konnte in der anti-FXIIa MAb 3F7 (50 mg/kg) Gruppe mit durchschnittlich $1,667 \pm 0,49$ Punkten kein Trend zur Verbesserung beobachtet werden. Dieser

Befund entsprach nicht der Erwartung, da in der vorherigen Studie bei einer Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) signifikant verbesserte neurologische Defizite beobachtet worden war. Im Anschluss wurde das Infarktvolumen mittels TTC-Vitalfärbung bestimmt. Wie erwartet konnte kein nekrotisches Gewebe im Hirn der Sham-operierten Gruppe detektiert werden und in der Saline-Gruppe wurde ein Bereich von $129,1 \pm 13,02 \text{ mm}^3$ als metabolisch inaktives Gewebe beobachtet (Abbildung 29 C). Die Auswertung ergab für die FXIIa-INH-Gruppe eine nicht signifikante Reduzierung des Infarktvolumens mit $105,7 \pm 17,78 \text{ mm}^3$. Das weist darauf hin, dass die Erhöhung der anti-FXIIa MAb 3F7-Dosis auf 50 mg/kg im murinen tMCAO-Modell den protektiven Effekt der Dosis 25 mg/kg auf das Infarktvolumen nicht zusätzlich steigert, sondern keine Protektion mehr vorhanden ist.

Plasmatests zur FXIIa-Inaktivierung

Auch in diesem Versuch wurde die FXIIa-Inaktivierung in den Versuchsgruppen überprüft. Dafür wurde den Mäusen im Anschluss an die Verhaltenstests, also 24 h nach der Einleitung der Reperfusion, final Blut entnommen. Das mit Zitrat antikoagulierte Plasma wurde automatisiert auf aPTT, PT und FXIIa-Aktivität getestet.

Die aPTT-Bestimmung ergab für die Sham-operierte Gruppe einen Mittelwert von $41,40 \pm 4,08 \text{ sec}$, was im Normbereich liegt (Abbildung 30 D). Die Saline-Gruppe zeigte eine moderate Verlängerung auf durchschnittlich $94,80 \pm 5,54 \text{ sec}$, wohingegen in der FXIIa-INH Gruppe eine signifikante Verlängerung auf im Mittel $146,6 \pm 11,46 \text{ sec}$ beobachtet wurde. Die statistische Analyse für Saline vs. Anti-FXIIa MAb 3F7 (50 mg/kg) ergab $p = 0,0095$ (Mann-Whitney Test).

Es wurden signifikante Unterschiede bei der Messung der FXIIa-Aktivität beobachtet (Abbildung 30 E). Im Verhältnis zur Kontakt-induzierten Gerinnung von Standard Humanplasma erreichte die Sham-operierte Gruppe einen Mittelwert von $106,3 \pm 13,49 \%$ und in der Saline-Gruppe $79,60 \pm 16,08 \%$. Wie erwartet gab es in der FXIIa-INH Gruppe eine drastische Reduzierung der FXIIa-Aktivität, die im Durchschnitt bei $9,433 \pm 0,94 \%$ lag ($p = 0,0238$).

Wie auch in der vorherigen Studie konnte in der Messung der TF-induzierten PT kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen gefunden werden (Abbildung 30 F). Die Mittelwerte lagen für die Sham-operierte Gruppe bei $8,933 \pm 0,20 \text{ sec}$; in der Saline-Gruppe bei $8,225 \pm 0,20 \text{ sec}$ und in der anti-FXIIa MAb 3F7 (50 mg/kg) Gruppe bei $8,567 \pm 0,27 \text{ sec}$. Hier wurde kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden ($p = 0,2845$).

Damit wurde gezeigt, dass die FXIIa-Inhibition mittels anti-FXIIa MAb 3F7 (50 mg/kg) erfolgreich war. Denn in dem von der intrinsischen Gerinnung abhängigen Test aPTT und in der FXIIa-Aktivitäts-

messung konnte auch 24 h nach Applikation des FXIIa-Inhibitors eine deutliche Reduzierung der FXIIa-abhängigen Gerinnung demonstriert werden. Dagegen wurde kein Effekt auf die PT beobachtet, bei der eine Koagulation über den TF-abhängigen Gerinnungsweg eingeleitet wird.

4.3.3 Therapeutische Behandlung mit rHA-Infestin-4 (200 mg/kg)

Ziel des Versuchs

Grundlage für diesen Versuch waren die Vorarbeiten, die durch Hagedorn et al. publiziert wurden. Dort wurde rHA-Infestin-4 (200 mg/kg) in einem prophylaktischen Behandlungsansatz untersucht. Hagedorn et al. konnten unter rHA-Infestin-4-Behandlung eine Reduzierung des Infarkt Volumens auf weniger als 17 % des Kontrollvolumens beobachten [Hagedorn et al. 2010]. Weiterhin war eine signifikante Verbesserung der neurologischen Funktionstests (Bederson Score und Grip Test) beobachtet worden [Hagedorn I et al. 2010].

In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob und in welchem Ausmaß sich der neuroprotektive Effekt von rHA-Infestin-4 auch in einem therapeutischen Behandlungsansatz bestätigen lässt. Denn die therapeutische Applikation der Substanz steht näher im Bezug zur klinischen Situation, da durch die zeitliche Limitierung einer rt-PA-Behandlung nur wenige Patienten mit einem ischämischen Schlaganfall davon profitieren können [Hacke W et al. 2008].

Basierend auf den vielversprechenden Resultaten der prophylaktische Therapie mit rHA-Infestin-4 von Hagedorn et al. wurde in der vorliegenden Arbeit erwartet, dass die Behandlung mit rHA-Infestin-4 zu einer Reduzierung der Defizite im Vergleich zu den Kontrolltieren führen würde. Die Saline-Gruppe (n = 15) und die rHA-Infestin-Gruppe (200 mg/kg; n = 15) erhielten 60 min nach Einleitung der Ischämie, also unmittelbar nach Einleitung der Reperfusion, eine i.v. Applikation der Substanz in gleichem Volumen. 24 h nach tMCAO wurden alle Tiere den in Kap. 3.5.2 beschriebenen Tests unterzogen. Dazu wurde mittels Bederson Score die globale neurologische Funktion bestimmt, und über den Grip Test die neuromotorischen Defizite. Anschließend wurde unter tiefer Narkose Zitrablut entnommen und das Hirngewebe für die Western Blot und die quantitative RT-PCR Analyse präpariert.

Mortalität 24 h nach Einleitung der Ischämie

Wie in den vorigen Studien wurde auch hier nach einer Reperfusionsdauer von 24 h die Anzahl der verstorbenen Tiere notiert. Alle Tiere der naiven (4/4) und der Sham-operierten Gruppe (5/5) über-

lebten. In der Positivkontrollgruppe überlebten 10/15 Tiere und in der therapeutisch mit rHA-Infestin-4 behandelten Gruppe 11/15 die Reperusionsperiode. Somit hatte die therapeutische FXIIa-INH-Behandlung keinen protektiven Effekt auf die Überlebensrate in dieser Studie. Auch hier wurde die Sterblichkeitsrate in der Statistik (p-Werte; Mann-Whitney Test) berücksichtigt.

Resultate der neurologischen Tests und des Infarkt volumens

Wie in den vorigen Studien beschrieben, wurde auch hier die Auswertung der neurologischen Defizite mittels Bederson Score und Grip Test 24 h nach Einleitung der Ischämie durchgeführt. Ebenso wurde im Anschluss das Infarktvolumen mittels TTC-Vitalfärbung bestimmt.

Bei der Auswertung mit Bederson Score war die „5“ die schlechteste Punktzahl, die bei stärksten neuromotorischen Defiziten (keine spontane Motilität, kein Fluchtverhalten, eingeschränkter Körpertonus) vergeben wurde. Wie erwartet wurden die Kontrollgruppen (Naive und Sham) ausschließlich mit „0“ bewertet. In der Saline-Gruppe wurde durchschnittlich eine $3,0 \pm 0,16$ vergeben. Vergleichbar dazu wurde in der rHA-Infestin-4 Gruppe $3,5 \pm 0,2$ Punkte erreicht (Abbildung 31 A).

Demzufolge konnte die therapeutische Behandlung mit dem FXIIa-INH keine Verbesserung der globalen neurologischen Defizite erzielen, was in starkem Kontrast zum neuroprotektiven Effekt der rHA-Infestin-4-Wirksamkeit im prophylaktischen Behandlungsansatz steht.

Anschließend wurde der Grip Test durchgeführt. Die Punktzahl „5“ war hierbei der beste zu erreichende Wert. Im Detail erreichten sowohl die naiven Tiere wie auch die Sham-operierten die maximale Leistung, während die Saline-Gruppe eine Punktzahl von $3,1 \pm 0,45$ versus $1,9 \pm 0,62$ in der FXIIa-INH-Gruppe erreichte (Abbildung 31 B). Unerwarteter Weise wurde auch im Grip Test keine Verbesserung der neurofunktionalen und koordinativen Defizite 24 h nach der Einleitung der Ischämie festgestellt werden. Wie auch im Bederson Score steht das im Gegensatz zum Befund von Hagedorn et al., denn dort war für die prophylaktische Therapie mit rHA-Infestin-4 in beiden Tests eine signifikante Verbesserung beobachtet worden [Hagedorn I et al. 2010]. Unmittelbar im Anschluss an die neurologischen Tests wurde das Hirn entnommen und die TTC-Vitalfärbung zur Bestimmung des Infarktvolumens durchgeführt. Auch im Vergleich der Infarktvolumina war statistisch kein Unterschied festzustellen. Die Positivkontrollgruppe erreichte ein durchschnittliches Infarktvolumen von $116,6 \pm 11,92 \text{ mm}^3$ versus $111,2 \pm 8,02 \text{ mm}^3$ in der rHA-Infestin-4-behandelten Gruppe (Abbildung 31 C). Kongruent zu den neurologischen Tests konnte für den therapeutischen Behandlungsansatz mit rHA-Infestin-4 keine Verbesserung des Infarktvolumens beobachtet werden. Dies steht auch im Wider-

spruch zu den Daten von Hagedorn et al., wo das Infarktvolumen durch den prophylaktischen Behandlungsansatz signifikant verringert war [Hagedorn I et al., 2010].

Daraus lässt sich schließen, dass die therapeutische Applikation von rHA-Infestin-4 zwar in einer Reperusionsperiode von 24 h keinen sichtbaren protektiven Effekt im Bederson Score, Grip Test und Infarktvolumen ausübt.

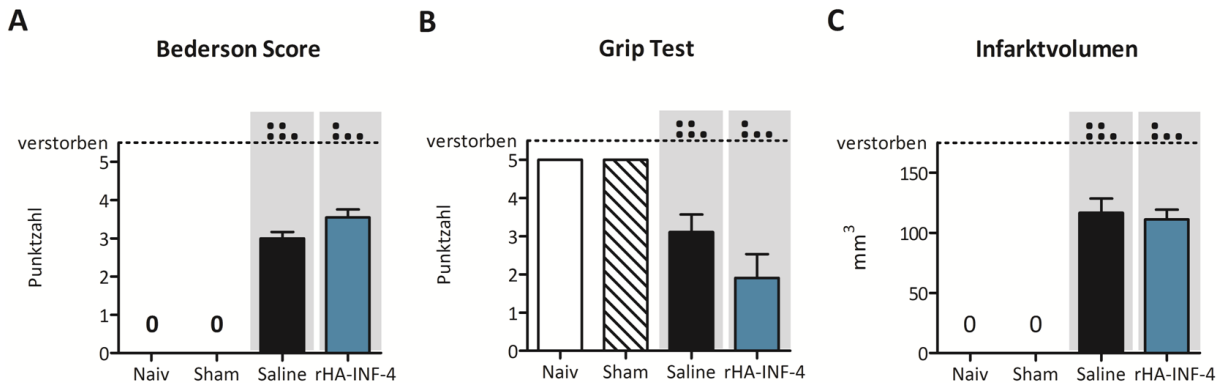


Abbildung 31: Neurologische Tests und Evaluierung des totalen Infarktvolumens

Nach der Reperusionsdauer von 24 h wurde zunächst die Auswertung neurologischer Defizite durchgeführt und anschließend das Infarktvolumen mittels TTC-Vitalfärbung analysiert. **A:** Bederson Score. „0“ steht für keine erkennbare Verhaltensänderung, und „5“ Punkte für den Verlust von spontaner Motilität und prämortalem Verhalten vergeben werden. **B:** Grip Test. In diesem Test wird eine „5“ für keine neurofunktionalen Defizite vergeben. Dahingegen zeigt die „0“ an, dass ein Tier nicht ausreichend Kraft und Koordination besaß, um an der Stange zu klettern. **C:** Infarktvolumen in mm³. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SEM. Jeder Punkt oberhalb der gestrichelten Linie kennzeichnet je ein verstorbene Tier. Die statistische Analyse wurde mittels Mann-Whitney Test und unter Berücksichtigung der verstorbenen Tiere durchgeführt, was durch die graue Schattierung verdeutlicht wird. Weiß: Naive; n = 4 / Grau: Sham-operierte; n = 5 / Schwarz: Saline; n = 10 / Blau: rHA-Infestin-4 (200 mg/kg); n = 11. Abkürzung: rHA-INF-4 - rHA-Infestin-4

Resultate der molekularbiologischen Testverfahren

Wie im prophylaktischen Behandlungsansatz mit anti-FXIIa MAb 3F7 wurde auch in der im Folgenden beschriebenen Studie eine Messung des zerebralen Fibrin(-ogen)-Proteingehalts durchgeführt. Abgelagertes Fibrin(-ogen) diente auch hier als Indikator für die Ischämie-induzierten Mikrothrombose. Im Anschluss wurden außerdem die mRNA-Expressionsprofile der Ischämie-induzierten Zytokine IL-1 β , TNF- α und TGF- β untersucht sowie von Endothelin-1 als Biomarker für die BHS-Integrität.

Relative Proteindichte von Fibrin(-ogen)

Im Zuge einer Ischämie mit nachfolgender Reperfusion werden thrombo-inflammatorische Prozesse eingeleitet. Es wird diskutiert, dass die Aktivierung von FXII die intravasale Mikrothrombose forciert und damit zur Ausbreitung des Infarktkerngebietes auf die Penumbra beiträgt [Kleinschnitz C et al. 2006; Pham M et al. 2010]. Da auch in der intrinsischen Gerinnung Fibrin das Endprodukt ist, wurde Fibrin(-ogen) als Indikator der zerebralen thrombotischen Reaktionen untersucht.

Auch hier wurde die Messung der Proteindichte in beiden Hemisphären durchgeführt, mit der Unterteilung in Basalganglien (BG) und Cortex (CX). Der nekrotische Infarktkern liegt beim tMCAO-Modell in den BG, während im CX die Penumbra lokalisiert ist. Die separierten Gewebe wurden mittels Western Blot untersucht. Es wurden alle Fibrinketten (Alpha, Beta und Gamma) in die Auswertung mit eingeschlossen und mittels des ubiquitär vorkommenden Referenzgens β -Actin normalisiert. Daher werden als Einheit *arbitrary Units* (AU) verwendet.

Im Infarktkern der BG in der naiven Gruppe wurde eine durchschnittliche Fibrin(-ogen)-Dichte von $0,23 \pm 0,2$ AU beobachtet (Abbildung 32 A). Verglichen damit stieg die Fibrin(-ogen)-Dichte schon in den Sham-operierten Tieren leicht auf $0,8 \pm 0,14$ AU an. Für die mit Saline behandelte Kontrollgruppe wurde ein Wert von $1,4 \pm 0,18$ AU beobachtet, während die rHA-Infestin-4-behandelte Gruppe eine relative Fibrin(-ogen)-Dichte von $1,9 \pm 0,30$ AU aufzeigte. Die statistische Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der rHA-Infestin-4-behandelten Gruppe ($p = 0,4068$). Dies steht im Gegensatz zu den bisherigen Befunden für die prophylaktische Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7. Dort konnte eine signifikante Verringerung der Fibrin(-ogen)-Ablagerung beobachtet werden. Durch Hagedorn et al. konnte die profunde neuroprotektive Wirksamkeit von rHA-Infestin-4 im prophylaktischen Ansatz demonstriert werden [Hagedorn I et al. 2010]. Die kaum veränderte Fibrin(-ogen)-Ablagerung im therapeutischen Behandlungsansatz der vorliegenden Studie deutet darauf hin, dass der Zeitpunkt der Applikation für die neuroprotektive Wirksamkeit durch rHA-Infestin-4 ausschlaggebend ist.

Die Analyse des Cortex der ipsilateralen Hemisphäre ergab für die naive Gruppe $0,4 \pm 0,23$ AU und in der Sham-operierten Gruppe $1,6 \pm 0,22$ AU (Abbildung 32 B). Die Saline-behandelte Kontrollgruppe erreichte $2,1 \pm 0,36$ AU. Im Gegensatz zu der unveränderten Fibrin(-ogen)-Ablagerung in den ischämischen BG konnte im ipsilateralen CX der rHA-Infestin-4-behandelten Gruppe eine reduzierte Fibrin(-ogen)-Ablagerung mit $1,7 \pm 0,24$ AU beobachtet werden. Dieser Befund weist drauf hin, dass auch im therapeutischen Behandlungsansatz der FXIIa-Hemmung die Verringerung der Mikrothrombosen zum Schutz der Penumbra beiträgt.

Auf der contralateralen Seite, die nicht von der Ischämie betroffen war, konnte kein Unterschied der Fibrin(-ogen)-Dichte beobachtet werden. Die Messung in der naiven Gruppe ergab in den BG 0,228

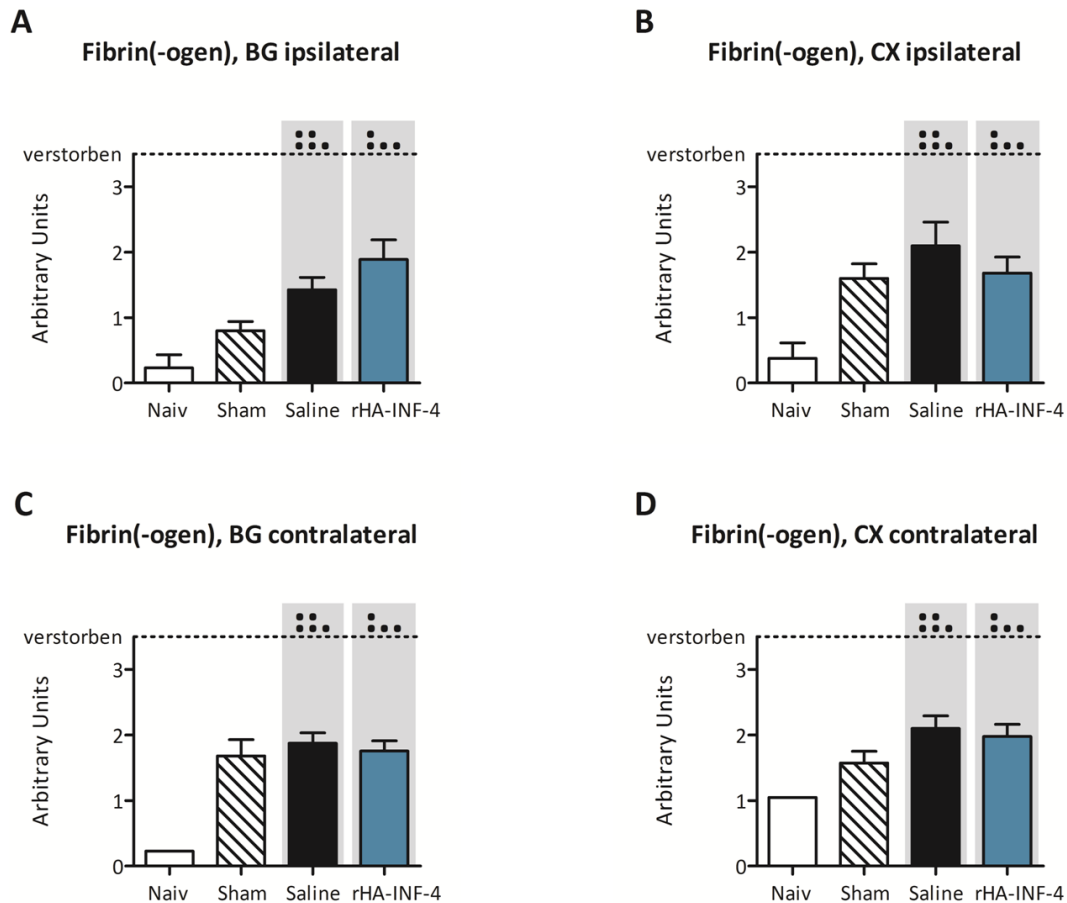


Abbildung 32: Relativer Fibrin(-ogen)-Gehalt nach zerebraler Ischämie

Nach einer Reperfusionsperiode von 24 h wurde der Fibrin(-ogen)-Gehalt in Basalganglien und Cortex beider Hemisphären mittels Western Blot bestimmt. Um eine Veränderung der Reperfusions-assoziierten Mikrothrombose unter FXII-Inhibition zu evaluieren, wurde Fibrin(-ogen) als Biomarker gewählt. Die relative Proteindichte von Fibrin(-ogen) ist im Verhältnis zum Referenzgen β -Actin aufgetragen. Der relative Fibrin(-ogen)-Gehalt der ipsilateralen Hemisphäre ist in den Grafiken **A** (BG) und **B** (CX) dargestellt. **A**: Saline vs. rHA-INF-4 $p = 0,52$. **B**: Saline vs. rHA-INF-4 $p = 0,3051$. Die Grafiken **C** (BG) und **D** (CX) zeigen die Fibrin(-ogen)-Dichte der contralaterale Hemisphäre. **C**: Saline vs. rHA-INF-4 $p = 0,3261$ **D**: Saline vs. rHA-INF-4 $p = 0,6784$. Alle p -Werte wurden mit Mann-Whitney Test und unter Berücksichtigung der verstorbenen Tiere ermittelt, was durch die graue Schattierung verdeutlicht wird. Die Balkendiagramme kennzeichnen den Mittelwert + SEM. Jeder Punkt oberhalb der gestrichelten Linie kennzeichnet je ein verstorbenes Tier. Weiß: Naiv; $n = 2$ / Grau: Sham-operierte, $n = 5$ / Schwarz: Saline; $n = 9$ / Blau: rHA-Infestin-4 (200 mg/kg); $n = 11$. Abkürzungen: BG- Basalganglien; CX- Cortex; rHA-INF-4 - rHA-Infestin-4.

$\pm 0,9$ AU und in der Sham-operierten Gruppe $1,681 \pm 0,24$ AU (Abbildung 32 C). In den BG der Saline-Gruppe wurde ein Wert von $1,873 \pm 0,16$ AU versus rHA-Infestin-4-Behandlung $1,756 \pm 0,15$ AU beobachtet, was kaum von der Sham-operierten Gruppe abweicht und damit vermutlich durch den chirurgischen Eingriff bedingt wird.

Dazu waren die Ergebnisse der Fibrin(-ogen)-Messung im CX der contralateralen Seite vergleichbar. In der naiven Gruppe ergab sich ein Wert von $1,047 \pm 0,00$ AU und in der Sham-operierten Gruppe $1,575 \pm 0,17$ AU (Abbildung 32 D). Und in den CX der Saline-Gruppe wurde ein leicht erhöhter Wert von $2,099 \pm 0,19$ AU versus rHA-Infestin-4-Behandlung mit $1,979 \pm 0,18$ AU beobachtet.

Relative mRNA-Expression von Biomarkern nach Ischämie

Auch in dieser Studie wurden die Expressionsprofile der Zytokine IL-1 β , TNF- α und TGF- β analysiert, um die Wirkung einer FXIIa-Inhibition auf die Ischämie-induzierten inflammatorischen Prozesse zu untersuchen. Alle angegebenen p-Werte wurden unter Berücksichtigung der Sterblichkeitsrate und mittels Mann-Whitney Test berechnet.

Die relative Genexpression des pro-inflammatorischen IL-1 β ergab in den ischämischen BG für die naiven Tiere einen Mittelwert von $0,06 \pm 0,05$ AU, für die Sham-Gruppe $1,3 \pm 0,4$ AU und für die Saline-Gruppe $13,06 \pm 8,0$ AU (Abbildung 33 A). Im Vergleich dazu konnte eine reduzierte mRNA-Expression in der rHA-Infestin-4-Gruppe vom Mittelwert $4,2 \pm 1,5$ AU beobachtet werden, was jedoch statistisch nicht signifikant war ($p = 0,4068$).

Die Auswertung der IL-1 β -Expression (Abbildung 33 B) im ischämischen CX ergab für die naiven Tiere einen Mittelwert von $0,02 \pm 0,008$ AU, für die Sham-Gruppe $1,5 \pm 0,43$ AU und für die Saline-Gruppe $8,0 \pm 2,9$ AU. Wie zuvor in den BG konnte auch im ischämischen Cortex der FXIIa-INH-Gruppe eine reduzierte IL-1 β -Expression von durchschnittlich $3,4 \pm 1,2$ AU beobachtet werden, die aber auch hier nicht statistisch signifikant unterschiedlich war ($p = 0,3615$). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass auch die therapeutische Behandlung mit rHA-Infestin-4 einen Effekt auf die IL-1 β -vermittelte Immunantwort im tMCAO-Modell ausübt.

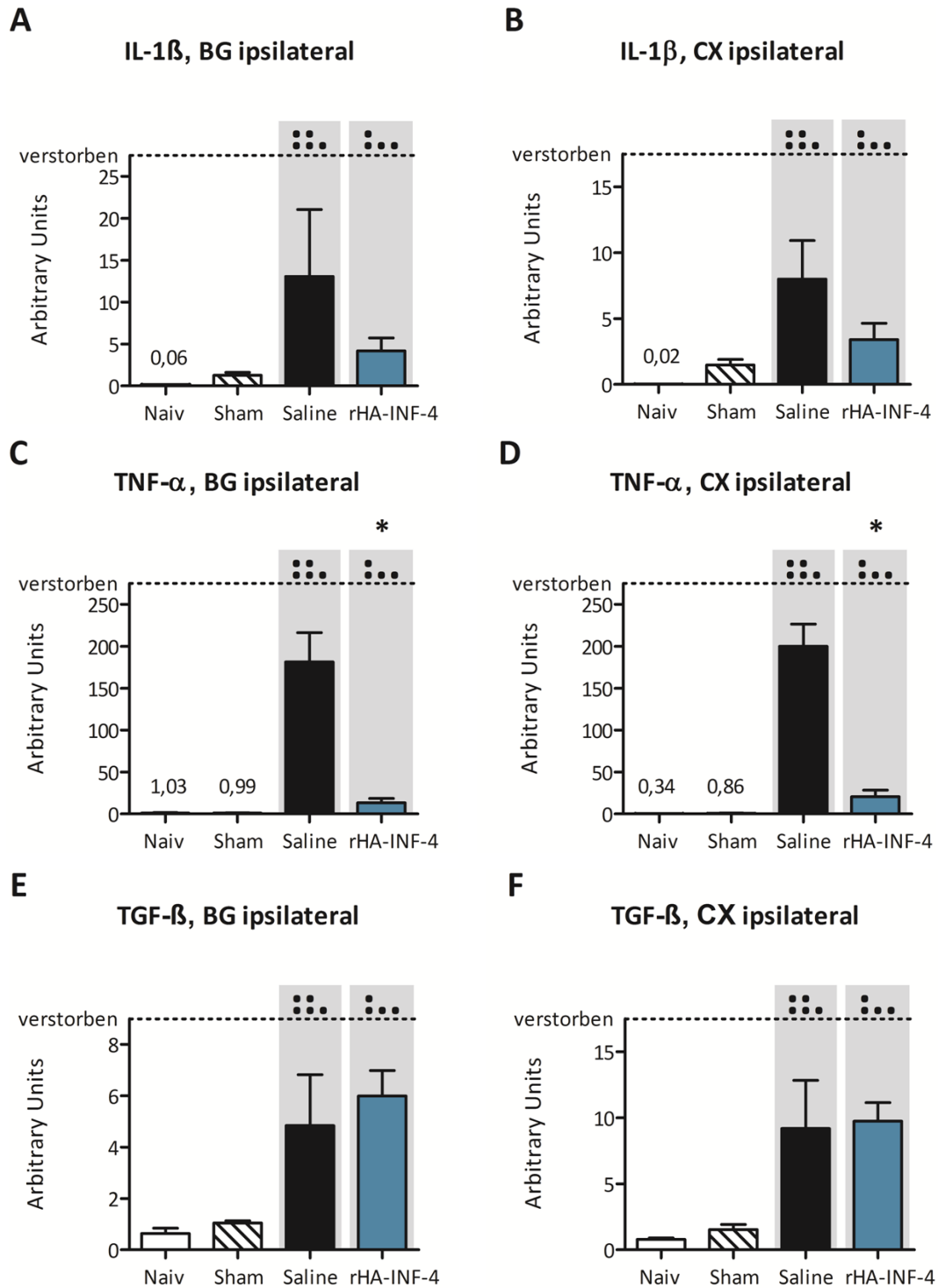
Als weiteres pro-inflammatorisches Zytokin wurde die mRNA-Expression von TNF- α untersucht. Im Infarktkern der BG erreichten die naiven Tiere durchschnittlich eine relative TNF- α -Expression über $1,0 \pm 0,6$ AU und die Sham-operierten Tiere $1,0 \pm 0,2$ AU analysiert (Abbildung 33 C). Die TNF- α -Expression in der Saline behandelten Kontrollgruppe stieg erheblich an auf $181,4 \pm 34,91$ AU. Damit

verglichen zeigte FXIIa-INH Gruppe eine signifikant reduzierte TNF- α -Expression mit einem Durchschnittswert von $13,3 \pm 5,09$ AU ($p < 0,0056$).

Diese Beobachtung wiederholte sich auch für die TNF- α -mRNA-Expression im ischämischen Cortex (Abbildung 33 D). Die relative Expression in der naiven Gruppe ergab $0,3 \pm 0,10$ AU und in der Sham-operierten Gruppe $0,9 \pm 0,15$ AU. Wie erwartet stieg auch hier in der mit Saline behandelten Gruppe die relative mRNA-Expression von TNF- α auf einen durchschnittlichen Wert von $199,9 \pm 26,57$ AU an. Im Einklang mit den Resultaten der BG stieg auch im CX der rHA-Infestin-4-behandelten Gruppe die TNF- α -Expression auf $20,7 \pm 7,65$ AU an. Die statistische Analyse der Gruppen erbrachte eine eindeutige Signifikanz ($p = 0,0056$). Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die FXIIa-Inhibition sowohl in den BG als auch im CX einen massiven Einfluss auf die TNF- α -Expression ausübt. Im Vergleich zur Positivkontrollgruppe betrug die gemessene mRNA in der FXIIa-INH-Gruppe lediglich 7 % in den BG und 10 % im CX.

Zusätzlich wurde die mRNA-Expression von TGF- β (Abbildung 33 E und F) analysiert. Das Zytokin TGF- β vermittelt neuroprotektive Effekte durch proliferative Signalwege. Es wirkt je nach Rezeptor auch auf die Astroglie und trägt somit zur Bildung von nicht-funktionalem Narbengewebe bei. Die basale Expression von TGF- β im Infarktkern der BG lag im Mittel bei den naiven Tieren um $0,6 \pm 0,21$ AU und bei den Sham-operierten bei $1,0 \pm 0,08$ AU. In der Saline-Gruppe war ein deutlicher Anstieg der TGF- β -mRNA zu verzeichnen, der durchschnittlich bei $4,8 \pm 1,9$ AU lag. Ähnlich dazu lag auch die relative mRNA-Expression der FXIIa-INH-Gruppe bei $6,0 \pm 0,98$ AU ($p = 0,5897$). Die Messung des TGF- β mRNA-Levels im ischämischen CX bestätigte diesen Befund. In der naiven Gruppe erreichte das mRNA-Level von TGF- β $0,8 \pm 0,10$ AU und in der Sham-operierten Gruppe ergab sich ein Mittelwert von $1,5 \pm 0,39$ AU. Deutlich darüber lag die TGF- β -Expression der Saline-Gruppe ($9,2 \pm 3,66$ AU) und der rHA-Infestin-4 Gruppe ($9,7 \pm 1,41$ AU). Die statistische Analyse der Gruppen zeigte keine Verbesserung durch die rHA-Infestin-4-Behandlung ($p = 0,6187$).

Endothelin-1 (Edn-1) wurde als Biomarker zur Evaluation der BHS-Integrität eingesetzt (Abbildung 33 G und H). Seine vermehrte Expression fördert die Dysfunktion der BHS durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität, was wiederum die Ödembildung forciert. Für die naive Gruppe wurde in den ischämischen BG eine Edn-1-mRNA-Expression von $0,5 \pm 0,09$ AU berechnet, und für die Sham-operierten Tiere $0,8 \pm 0,1$ AU. In der mit Saline behandelten Gruppe war eine deutliche Erhöhung der



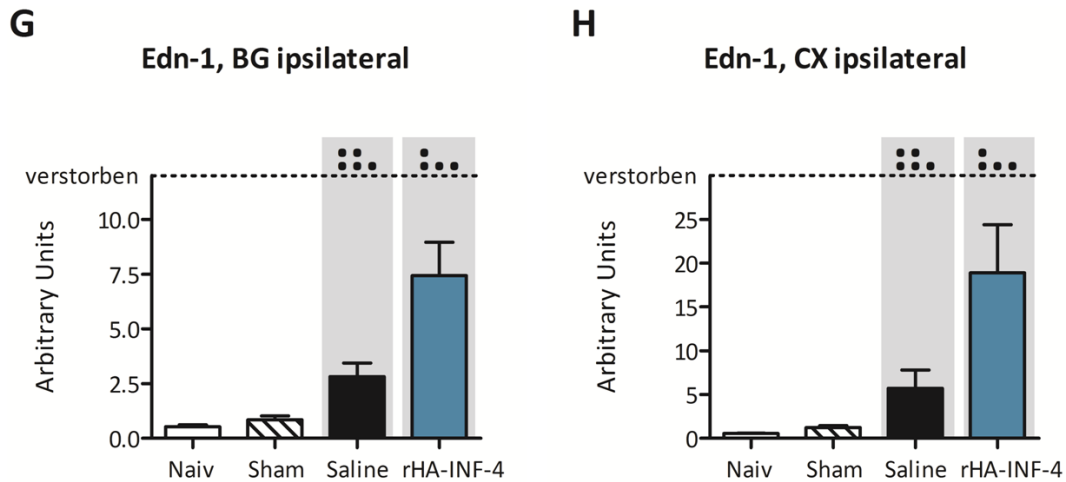


Abbildung 33: mRNA-Expressionsprofil nach zerebraler Ischämie

Um das Ausmaß der Ischämie/Reperfusion-induzierten Inflammation zu evaluieren, wurde die mRNA-Expression der Zytokine IL-1 β , TNF- α und TGF- β in den ipsilateralen Hemisphären bestimmt. Zusätzlich wurde Edn-1 als Biomarker für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke analysiert. Die relative Genexpression wurde nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode anhand eines Kalibrators und eines Referenzgens berechnet. Die Genexpression des pro-inflammatorischen IL-1 β ist in den Grafiken **A** (BG) und **B** (CX) dargestellt. **A**: Saline vs. rHA-INF-4; $p = 0,4068$. **B**: Saline vs. rHA-INF-4; $p = 0,3615$. Die Grafiken **C** (BG) und **D** (CX) zeigen die Expression des neuroprotektiven und pro-inflammatorischen Mediators TNF- α . **C**: Saline vs. rHA-INF-4 $p = 0,0056$. **D**: Saline vs. rHA-INF-4; $p = 0,0056$. Die relative Expression des immunomodulatorischen TGF- β werden in den Grafiken **E** (BG) und **F** (CX) dargestellt. **E**: Saline vs. rHA-INF-4 $p = 0,5897$. **F**: Saline vs. rHA-INF-4; $p = 0,6187$. Schließlich ist in den Grafiken **G** (BG) und **H** (CX) die Expression von Edn-1 als Biomarker für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke aufgetragen. **G**: Saline vs. rHA-INF-4; $p = 0,3261$. **H**: Saline vs. rHA-INF-4; $p = 0,3710$. Alle p -Werte wurden mit Mann-Whitney Test und unter Berücksichtigung der verstorbenen Tiere ermittelt, was durch die graue Schattierung verdeutlicht wird. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SEM. Jeder Punkt oberhalb der gestrichelten Linie kennzeichnet je ein verstorbenes Tier. Weiß: Naiv; $n = 2$ / Grau: Sham-operiert; $n = 4$ / Schwarz: Saline; $n = 10$ / Blau: rHA-Infestin-4 (200 mg/kg); $n = 11$. Abkürzungen: BG- Basalganglien; CX- Cortex; Edn-1- Endothelin-1; rHA-INF-4 - rHA-Infestin-4.

mRNA-Expression zu beobachten, im Mittel bei $2,8 \pm 0,61$ AU. Die Auswertung in der FXIIa-INH-Gruppe übertraf unerwarteter Weise das mRNA-Level der Kontrollgruppen mit durchschnittlich $7,4 \pm 1,52$ AU. Die statistische Auswertung ergab jedoch keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,3261$). Diese Beobachtung galt auch für den ischämischen Cortex. In der Saline-Gruppe betrug die relative Edn-1-mRNA-Expression $5,70 \pm 2,11$ AU versus $18,9 \pm 5,4$ AU in der rHA-Infestin-4-Gruppe. Der Unterschied zwischen der Gruppen war auch hier statistisch nicht signifikant ($p = 0,3710$). Dagegen

gab es keine bedeutsamen Schwankungen in der naiven Gruppe ($0,6 \pm 0,02$ AU) und in der Sham-operierten Gruppe ($1,2 \pm 0,23$ AU).

Das bedeutet, nach der therapeutischen Behandlung mit rHA-Infestin-4 wurde vermehrt Edn-1 freigesetzt. In wie fern sich die damit assoziierte erhöhte Gefäßpermeabilität als Konsequenz auf eine Ödembildung auswirkte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Plasmatests zur FXIIa-Inaktivierung

In diesem Versuch wurde ebenfalls anhand von Plasmatests die Inaktivierung von FXII überprüft. Wie bereits beschrieben, wurde den Mäusen im Anschluss an die Verhaltenstests, also 24 h nach der Einleitung der Ischämie, final Blut entnommen. Das mit Zitrat antikoagulierte Plasma wurde automatisiert mit dem BCS® XP auf aPTT, PT und FXIIa-Aktivität getestet.

In der naiven Gruppe ergab die aPTT-Messung normale Werte für C57/Bl6-Mäuse mit $32,8 \pm 2,01$ sec (Abbildung 34 A). In Sham-operierten und der mit Saline behandelten Gruppe zeigte sich eine moderate Verlängerung der aPTT, die durch den Verbrauch von FXIIa durch den chirurgischen Eingriff verursacht worden sein kann. Im Detail erreichte die Sham-operierte Gruppe $74,58 \pm 15,48$ sec und die Saline-Gruppe $91,8 \pm 7,97$ sec. In der rHA-Infestin-4-Gruppe konnte eine signifikante Verlängerung der aPTT beobachtet werden, denn hier überschritt die Kontakt-induzierte Gerinnungszeit bei 8 von 11 Tieren die obere Messgrenze von 180 sec. Für die 3 verbliebenen Tiere wurde im Mittel eine aPTT von $140,9 \pm 7,68$ sec gemessen, die im Vergleich zur Saline-Gruppe signifikant verlängert war ($p = 0,014$; Mann-Whitney Test).

Die Aktivitätsbestimmung vom plasmatischen FXII diente außerdem zur Kontrolle der erfolgreichen FXIIa-Inhibition (Abbildung 34 B). Die Messdaten sind in Relation zu Standard Humanplasma angegeben. Wie erwartet zeigte sich in der naiven Gruppe und der Sham-operierten Gruppe die maximale FXII-Aktivität mit 94,74 % SHP (Naive) bzw. $78,4 \pm 16,13$ % SHP (Sham-operierte). Passend zur moderaten aPTT-Verlängerung war auch die FXIIa-Aktivität der Saline-Gruppe leicht verringert. In der mit rHA-Infestin-4 behandelten Gruppe wurde mit durchschnittlich $30,5 \pm 0,59$ sec die geringste Aktivität beobachtet. Da rHA-Infestin-4 eine Halbwertszeit von etwa 4,6 h in Mäusen besitzt [Hagedorn I et al. 2010], zeigte sich durch die biologische Elimination bereits eine reduzierte FXIIa-Hemmung 24 h nach der Applikation.

Zusätzlich wurde die Funktionalität der extrinsischen Koagulation mittels PT bestimmt (Abbildung 34 C). Generell lagen die Messdaten aller Versuchsgruppen in einem Intervall zwischen 7,1 sec bis maximal 10,1 sec. Dies entspricht dem Normbereich für Mäuse. Es ergab sich keine Veränderung durch die

FXIIa-INH-Behandlung. Detail war die PT für die naive Gruppe $9,7 \pm 0,07$ sec, für die Sham-operierte Gruppe $8,4 \pm 0,21$ sec, für die Saline-Gruppe $8,5 \pm 0,19$ sec und für die rHA-Infestin-4-Gruppe $8,6 \pm 0,15$ sec.

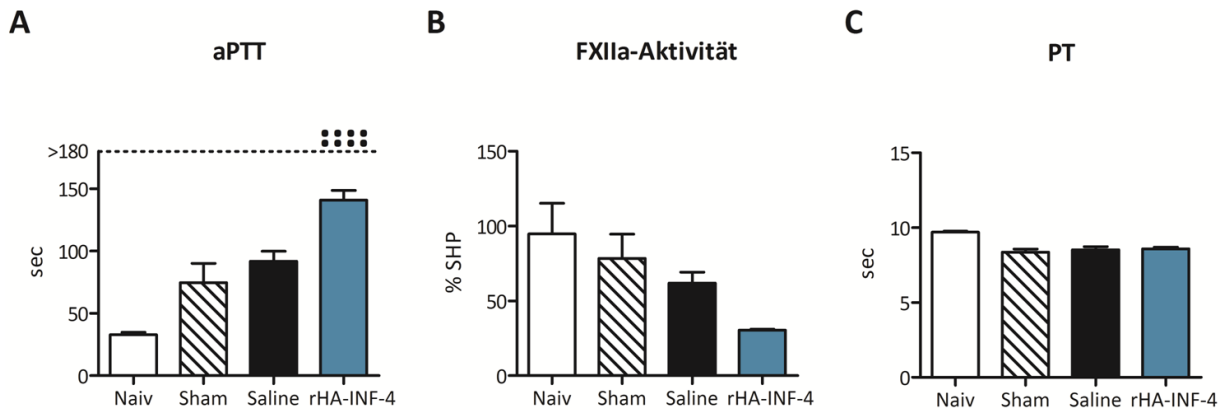


Abbildung 34: Plasmatests zur Evaluierung des Gerinnungsstatus

Nach der Reperfusionsdauer von 24 h wurde Plasma zur Evaluierung des Gerinnungsstatus entnommen. **A:** Die aPTT in sec, eingeleitet durch die intrinsische Gerinnung. Saline vs. rHA-INF-4 $p = 0,014$. Alle Proben außerhalb der Messgrenze von 180 sec sind als Punkt oberhalb der gestrichelten Linie aufgetragen. **B:** FXIIa-Aktivität, relativ zu SHP in %. Saline vs. rHA-INF-4 $p = 0,0002$. **C:** PT, Funktionalität der extrinsischen Koagulation in sec. Saline vs. rHA-INF-4 $p = 0,3764$. Alle p -Werte wurden anhand des Mann-Whitney Tests berechnet. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SEM an. Weiß: Naive; $n = 4$ / Grau: Sham-operierte; $n = 5$ / Schwarz: Saline; $n = 10$ / Blau: rHA-Infestin-4 (200 mg/kg); $n = 11$. Abkürzungen: SHP - Standard Humanplasma; rHA-INF-4 - rHA-Infestin-4.

4.3.4 Erkenntnisse aus den Studien des murinen Schlaganfallmodells

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Ansätze gewählt: (1) Prophylaktische Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 (10 und 25 mg/kg); (2) Prophylaktische Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 (50 mg/kg) und (3) Therapeutische Behandlung mit rHA-Infestin-4 (200 mg/kg). Im ersten Ansatz konnte für die Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) deutlich verbesserte klinische Defizite und ein signifikant reduziertes Infarktvolume im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Darüber hinaus wurde in dieser Gruppe eine deutliche Verringerung der Fibrin(-ogen)-Ablagerung und Expression von IL-1 β , TGF- β und Endothelin-1 detektiert werden. Eine Erhöhung der Dosis auf 50 mg/kg anti-FXIIa MAb 3F7 erbrachte keine Verbesserung, jedoch zeigte sich bei der FXIIa-Inhibition (25 mg/kg) eine gesteigerte Überlebensrate der Tiere von 100 %. Der therapeutische Behandlungsansatz mit rHA-Infestin-4 ergab keine Verbesserung der klinischen Defizite.

5. DISKUSSION

Übersicht

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei neuartige Antithrombotika zur Inhibition von FXIIa in verschiedenen Thrombosemodellen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass eine FXIIa-Inhibition in den gewählten arteriellen Thrombosemodellen zu einem profunden Schutz vor einer thrombotischen Gefäßokklusion in verschiedenen Spezies führte. Darüber hinaus konnte in einem murinen Modell der venösen Thrombose die antithrombotische Wirksamkeit der FXIIa-Inhibition bestätigt werden. Des Weiteren konnte im Mausmodell des ischämischen Schlaganfalls der neuroprotektive Effekt bei prophylaktischer Behandlung durch die FXIIa-Inhibitoren beobachtet werden.

Die physiologische Funktion von FXII war lange Zeit unklar. Anders als bei Mangelzuständen der Gerinnungsfaktoren VII, VIII, IX und XI zeigen Patienten mit FXII-Defizienz klinisch keine Blutungsneigung [Ratnoff OD et al. 1955]. Aus diesem Grund wurde FXII lange als unbedeutend für die Koagulation eingestuft. In den vergangenen zehn Jahren wurde diese Annahme jedoch revidiert. Um die physiologische Rolle von FXII *in vivo* zu erforschen, wurde in Mäusen eine Deletion des FXII-Gens durchgeführt, wodurch das Blut der FXII-K.O.-Mäuse kein FXII-Zymogen enthält [Pauer HU et al. 2004]. Untersuchungen dieser K.O.-Mäuse in verschiedenen Thrombosemodellen belegten, dass die FXIIa-vermittelte Koagulation in der Hämostase keine tragende Rolle spielt [Renné T et al. 2005]. Dahingegen wurden Hinweise dafür gefunden, dass ein Mangel an FXII antithrombotisch wirkt, ohne jedoch eine Blutungsneigung hervorzurufen. Nachfolgende Untersuchungen deuteten darauf hin, dass FXIIa die Fremdoberflächen-induzierte Thrombinbildung forciert [Renné T et al. 2005].

Die daraus folgende Hypothese, dass Thrombose und Hämostase teils durch separate Prozesse eingeleitet werden, hat neues Interesse an der (patho-)physiologischen Rolle des Gerinnungsfaktors XII geweckt. Aus medizinischer Sicht ist die Möglichkeit zur selektiven Hemmung der pathologischen Thrombose ein bedeutender Fortschritt. Besonders bei kardiovaskulären Erkrankungen und massiven chirurgischen Eingriffen stellt ein erhöhtes Blutungsrisiko durch die gängigen Antikoagulationsstrategien ein ernstzunehmendes Problem dar. Eine stabile Antikoagulation erfordert eine engmaschige Überwachung des Patienten und während der Antagonisation der Gerinnungshemmung birgt ein Ungleichgewicht zwischen Gerinnung und Antikoagulation ein erhöhtes Risiko für eine Blutungsneigung oder Thrombosen.

Zurzeit sind jedoch keine Alternativen zur systemischen Antikoagulation für die Anwendung am Patienten zugelassen. Die gängigen Therapeutika wirken meist inhibierend auf FXa, Thrombin, oder die Vitamin-K-abhängige Carboxylierung der Gerinnungsfaktoren VII, IX und X. Trotz fehlender Carboxylierung zirkulieren die Faktoren dann zwar im Blut, aber können nicht in den aktivierten Zustand überführt werden und sind daher funktionslos. Dadurch kann die physiologische Koagulation nicht ablaufen. Das bedeutet letztendlich, dass die Thromboseprophylaxe durch ein erhöhtes Blutungsrisiko „erkauft“ wird.

Die Annahme, dass die zugrunde liegenden Mechanismen von Hämostase und Thrombose separiert werden können, bietet eine innovative Strategie für einen antithrombotischen Therapieansatz, bei dem eine Thromboseprophylaxe nicht mit einem erhöhten Blutungsrisiko einhergeht. Als Initiator der intrinsischen Koagulation ist FXIIa eine vielversprechende Zielstruktur. Durch eine pharmakologische Hemmung von FXIIa bestünde erstmals die Möglichkeit einer selektiven antithrombotischen Therapie mit reduzierten Nebenwirkungen.

5.1 FXIIa-Inhibition in der arteriellen Thrombose

Eine arterielle Thrombose entsteht zumeist auf der Grundlage einer arteriosklerotischen Vorerkrankung. Durch die Ruptur einer arteriosklerotischen Plaque wird unter anderem Kollagen der subendothelialen Matrix exponiert. Dies führt zur Einleitung von Gerinnungsprozessen, bei denen sehr wahrscheinlich die FXII-Aktivierung eine thrombotische Gefäßokklusion auf Ebene der Thrombinbildung und der engen Vernetzung des Fibringerüstes vorantreibt [Konings J et al. 2012; Renné et al. 2005].

Mit diesem Hintergrund war ein Projekt der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Modellen zu überprüfen, ob eine FXIIa-Inhibition einen wirksamen antithrombotischen Schutz bietet. Gleichzeitig wurde untersucht, ob die selektive antithrombotische Behandlung ohne die bisher damit assoziierten Blutungsrisiken einhergeht.

FXIIa-Inhibition im Modell der mechanisch induzierten Thrombose in der Maus

Zur Evaluierung der antithrombotischen Wirksamkeit des anti-FXIIa MAb 3F7 im arteriellen System wurde zunächst das murine Modell der Aortenkompression untersucht (Kap. 4.1.1). Durch eine mechanische Reizung wurde eine Thrombose induziert, die in den Kontrolltieren innerhalb weniger Minuten zu einer stabilen Gefäßokklusion führte. Die pharmakologische Hemmung von FXIIa mittels anti-FXIIa MAb 3F7 wurde in den Dosierungen 10 und 20 mg/kg untersucht. Überraschenderweise konnte für beide Behandlungsansätze kein protektiver Effekt im Verlauf der thrombotischen Okklu-

sion durch eine FXIIa-Inhibition beobachtet werden. Dennoch konnte die effektive Hemmung von FXIIa durch eine verlängerte aPTT bestätigt werden. Das bedeutet die Kontrollen sind valide und der applizierte FXIIa-INH war wirksam.

Das Resultat dieser Studie legt nahe, dass das gewählte Modell zur Untersuchung der intrinsischen Gerinnung und potenzieller Inhibitoren nur bedingt geeignet ist. Durch die massive Kompression wird vermutlich die subendotheliale Matrix der Aorta freigelegt und induziert die Freisetzung von TF. Somit wird die Thrombose TF-abhängig eingeleitet und eine ergänzende Thrombinbildung durch eine FXII-Aktivierung spielt vermutlich nur eine untergeordnete Rolle. Da in diesem Modell die mechanische Kompression auf den gesamten Gefäßabschnitt ausgeübt wird, ist die Verletzung außerdem ringförmig, wodurch wahrscheinlich TF-vermittelt ausreichend Thrombin hergestellt wird. Daher wurde in diesem Modell eine Grenze des FXIIa-INH-Ansatzes deutlich.

Kontrovers dazu sind Daten aus dem gleichen Modell mit FXII-K.O.-Mäusen. Hier konnten Renné et al. in den FXII-defizienten Tiere keine finale thrombotische Okklusion beobachten. Jedoch wurde in 60 % der Mäuse ein reduzierter Blutfluss gefunden, was vermutlich durch eine Thrombose verursacht wurde. Einige Tiere zeigten außerdem eine Gefäßokklusion, die jedoch instabil war und innerhalb von 115 sec nach Okklusion embolisierten [Renné T et al. 2005]. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Vermutung, dass eine wichtige Funktion von FXIIa die unterstützende Versorgung mit Thrombin und der Stabilisierung des Fibringerüsts bei der Koagulation ist [Konings J et al. 2011].

Die Diskrepanz zwischen FXII-defizienten Tieren und einer selektiven Hemmung von FXIIa in diesem Thrombosemodell legt nahe, dass der chronische Mangel an FXII in den K.O.-Tieren nicht mit einer kurzfristigen Hemmung des aktivierten FXII vergleichbar ist. Möglicherweise unterscheiden sich die koagulativen Reaktionen in den FXII-K.O.-Mäusen noch in anderen Bereichen von denen der Wildtypen, was zur Ausbildung der instabilen Thromben führte. Dies wurde allerdings noch nicht tiefer untersucht. Zudem ist der verwendete Antikörper gegen die humane Form des FXIIa gerichtet. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass Maus-spezifische Spaltprodukte des FXIIa der Inhibition entgehen und weiterhin aktiv bleiben, oder die Affinität zum murinen FXIIa niedriger ist, als zum humanen FXIIa. Dies wurde außerhalb dieser Arbeit in internen Studien der Arbeitsgruppe belegt, die derzeit noch nicht veröffentlicht sind.

Die pharmakologische FXIIa-Inhibition mit rHA-Infestin-4 zeigte ein vergleichbares Resultat mit der in FXII-defizienten Mäusen durchgeführten Studie [May F et al. 2013]. Hier konnte eine eindeutige protektive Wirksamkeit des spezifischen FXIIa-Inhibitors beobachtet werden. Da durch eine selektive

FXIIa-Hemmung mit dem monoklonalen Antikörper keine signifikante Verbesserung erreicht werden konnte, deutet das eventuell auf einen antikoagulativen Nebeneffekt durch rHA-Infestin-4 hin. In der Tat ist bekannt, dass rHA-Infestin-4 zwar ein potenter FXIIa-Inhibitor ist, jedoch auch zu geringen Anteilen FXa und Plasmin hemmt [Campos IT et al. 2002; Hagedorn I et al. 2010]. Darüber hinaus könnte rHA-Infestin-4 den murinen FXIIa potenter hemmen, als der anti-FXIIa MAb 3F7. Des Weiteren wurden die beiden FXIIa-Inhibitoren zwar im gleichen Modell, aber durch unterschiedliche Personen getestet. Von daher könnte die Vergleichbarkeit zwischen den Studien limitiert sein, da die erfolgreiche Durchführung des Modells zu großen Teilen auf Erfahrung beruht.

FXIIa-Inhibition in der arteriellen FeCl₃-induzierten Thrombose

In der vorliegenden Arbeit wurde in den *Aa. femorales* der Spezies Kaninchen das Modell der FeCl₃-induzierten Thrombose durchgeführt (Kap. 4.2.1). Die Applikation von FeCl₃ stellt einen starken thrombotischen Reiz dar, denn die Chemikalie durchdringt das Endothel von außen nach innen. Zurzeit werden verschiedene zugrundeliegende Mechanismen diskutiert, die die Thrombose hervorrufen. Auf der einen Seite wird vermutet, dass FeCl₃ die Gefäßwand schädigt und auf diese Art die Thrombose induziert [Eckly A et al. 2011]. Auf der anderen Seite postulierten Barr et al., dass sich zunächst Erythrozytenfragmente durch den Kontakt mit FeCl₃ am Endothel anheften und über noch unbekannte Prozesse die Thrombose induzieren, ohne jedoch eine Endothel-Denudation herbeizuführen [Barr JD et al. 2013]. In beiden Fällen unterstützt vermutlich letztendlich eine Plättchen-Rekrutierung und -Aktivierung durch die Sekretion von anorganischen Poly-P und Zink-Ionen die FXIIa-Bildung [Mahdi F et al. 2002; Müller F et al. 2009]. Demzufolge induziert FeCl₃ artifiziell die Entstehung von Plättchen-reichen Thromben, die strukturell denen ähneln, die unter pathophysiologischen Bedingungen im arteriellen Hochdrucksystem entstehen. Die intrinsischen Gerinnungsprozesse gewährleisten dabei vermutlich durch die unterstützende Versorgung mit Thrombin die Bildung eines Fibrin-reichen, okklusiven Gerinnsels.

Eine Studie der vorliegenden Arbeit konnte zeigen, dass die FXIIa-Hemmung mittels anti-FXIIa MAb 3F7 im Modell der FeCl₃-induzierten arteriellen Thrombose zuverlässig eine thrombotische Okklusion der Arterien im Kaninchen verhinderte. Gleichzeitig zeigten zusätzliche Hämostasetests keine mit der FXIIa-INH-Behandlung verbundene Blutungsneigung. Dagegen entwickelte sich wie erwartet in der Kontrollgruppe eine stabile Okklusion, was die tragende Rolle von FXIIa in diesem Thrombosemodell belegt. Es ist wahrscheinlich, dass auch unter den gewählten Bedingungen die initiale Adhäsion von Erythrozyten und Plättchen normal ablief. Jedoch fehlte unter FXIIa-INH-Behandlung die supplemen-

tierende Thrombinversorgung, die durch die intrinsische Gerinnung gewährleistet wird. Daher scheint die thrombotische Kapazität aus aktivierten Plättchen und extrinsischen Gerinnungsfaktoren insuffizient für die Ausbildung eines okklusiven Thrombus zu sein.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Studien, die im murinen Modell der FeCl_3 -induzierten Thrombose durchgeführt wurden. Hier konnte gezeigt werden, dass bei einer chronischen FXII-Defizienz sowohl in mesenterialen Arteriolen als auch in der *A. carotis communis* das Thrombuswachstum ins Gefäßinnere gestört ist. Dennoch konnte eine unbeeinträchtigte initiale Plättchen-Adhäsion beobachtet werden [Renné T et al. 2005; Wang X et al. 2005]. Darüber hinaus konnte für den zweiten spezifischen FXIIa-INH rHA-Infestin-4 eine protektive, antithrombotische Wirksamkeit in FeCl_3 -induzierten Thrombosemodellen in den Spezies Maus, Ratte und Kaninchen gezeigt werden [Hagedorn I et al. 2010; Larsson M et al. 2014; May F et al. 2013]. Zusammen betrachtet untermauern diese Befunde also die Hypothese, dass FXIIa im Modell der FeCl_3 -induzierten Thrombose unter arteriellen Flussbedingungen wesentlich zur okklusiven Thrombusbildung beiträgt.

In einem weiteren FeCl_3 -induzierten murinen Thrombosemodell wurde darüber hinaus durch Revenko et al. eine potenzielle antithrombotische Wirksamkeit durch eine Depletion des FXII-Zymogens getestet. Dafür wurde das FXII-Gen in Wildtyp-Mäusen mittels Antisense-Oligonucleotid Technik ausgeschaltet. Unter Ausschluss von FXII beobachtete die Gruppe eine deutlich gestörte und verzögerte Thrombusbildung, wobei sich kontinuierlich Plättchen-Aggregate vom Thrombus ablösten. Dies schützte in diesem Modell vor einer thrombotischen Okklusion, was im Einklang mit der protektiven Wirksamkeit des anti-FXIIa MAbs 3F7 in der vorliegenden Arbeit steht [Revenko AS et al. 2011].

Weitere Untersuchungen mit zwei selektiv gegen das Zymogen FXII gerichteten Antikörpern im murinen FeCl_3 -induzierten Thrombosemodell demonstrierten einen protektiven Effekt der FXII-Inhibition *in vivo* [Matafonov A et al. 2014]. Dabei wurden FXII-defiziente Mäuse mit humanem FXII rekonstituiert, und gleichzeitig wurde je einer der monoklonalen anti-FXII Antikörper verabreicht. Dieser Therapieansatz resultierte in einem profunden Schutz vor einer FeCl_3 -induzierten thrombotischen Okklusion, vergleichbar zu den Beobachtungen im Kaninchen-Thrombosemodell der vorliegenden Arbeit.

Zusammen genommen konnte ein deutlicher antithrombotischer Effekt durch die Hemmung von FXII(a) in den Spezies Maus, Ratte und Kaninchen unter arteriellen Flussbedingungen *in vivo* nachgewiesen werden. Weiterhin wurde demonstriert, dass die FXII(a)-Inhibition speziesübergreifend antithrombotisch wirkt, ohne dabei die hämostatischen Kapazität zu beeinflussen. Daher erscheint die

Hemmung von FXII(a) in der arteriellen Thrombose als eine attraktive Strategie, da ein speziesunabhängiger, potenter antithrombotischer Effekt demonstriert werden konnte. Außerdem belegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass die hämostatische Kapazität durch die FXIIa-Inhibition unbeeinflusst bleibt, was durch die oben beschriebenen Publikationen unterstützt wird. Daher lässt sich annehmen, dass eine FXIIa-Inhibition auch im humanen Organismus einen therapeutischen Schutz vor einer arteriellen Thrombose bietet, während die physiologische Hämostase nicht beeinträchtigt wird.

5.2 FXIIa-Inhibition in der venösen Thrombose

In aktuellen Studien wurden Hinweise dafür gefunden, dass die Aktivierung von FXII im Rahmen der NETose zu einer Thrombusbildung unter venösen Flussbedingungen beiträgt [Fuchs TA et al. 2010; von Brühl ML et al. 2012]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die schützende Wirksamkeit der FXIIa-Inhibition in Modellen der venösen Thrombose untersucht (Kap. 4.1.2 und 4.2.1). Im Detail wurde dabei überprüft, ob anti-FXIIa MAb 3F7 auch unter venösen Flussbedingungen das dreidimensionale Thrombuswachstum hemmt und in wie weit die physiologische Hämostase dadurch beeinflusst wird. Damit könnte die Indikation eines FXIIa-INH möglicherweise auf die Behandlung einer TBVT erweitert werden.

Im Vergleich zu der großen Anzahl an veröffentlichten Studien zur Untersuchung einer FXII(a)-Inhibition unter arteriellen Flussbedingungen sind nur wenige Studien publiziert worden, die diesen Ansatz unter venösen Bedingungen untersuchten.

Da die Lungenembolie eine verbreitete Komplikation der TBVT ist, wurde in FXII-K.O.-Mäusen das Modell der letalen pulmonalen Thromboembolie durchgeführt [Renné T et al. 2005]. Dabei wurde den Mäusen Adrenalin und Kollagen appliziert, wodurch systemisch eine Thrombusbildung eingeleitet wird. Kollagen vermittelt sowohl die Plättchen- als auch die FXII-Aktivierung. Die Embolisierung der Thromben in die Lungenkapillaren führt letztendlich zum Tod [Renné T et al. 2005]. Es wurde beobachtet, dass mehr als 35 % der FXII-K.O.-Tiere diesen massiven thrombotischen Stimulus überlebten, wohingegen keines der Kontrolltiere länger als 5 min überlebte. Renné et al. schlossen daraus, dass die Aktivierung von FXII in diesem Modell zur Thrombusbildung und nachfolgender Embolie beiträgt. Die FXII-Defizienz hatte in der arteriellen Thrombose eine defekte Thrombusbildung gezeigt. Darauf basierend vermuteten Renné et al. diesen Mechanismus auch als Ursache für die reduzierte Mortalitätsrate bei FXII-Defizienz in diesem Thromboembolie-Modell [Renné T et al. 2005].

In der vorliegenden Arbeit wurde die pharmakologische FXIIa-Hemmung mittels anti-FXIIa MAb 3F7 im murinen Modell der FeCl₃-induzierten venösen Thrombose untersucht. Wie erwartet verursachte die Applikation von FeCl₃ (5 %) in den Kontrolltieren eine stabile thrombotische Okklusion. Im Gegensatz dazu konnte nach der Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 ein profunder Schutz vor einer thrombotischen Gefäßokklusion unter FXII-Hemmung beobachtet werden (Kap. 4.1.2). Es wurden außerdem keine auffälligen Druckschwankungen am untersuchten Gefäß *V. cava* detektiert, die auf eine nicht-okklusive Thrombusbildung deuten könnten. Auch konnte trotz des massiven chirurgischen Eingriffs makroskopisch keine erhöhte Blutungsneigung unter FXIIa-Inhibition festgestellt werden. Demzufolge konnte gezeigt werden, dass die FXIIa-Hemmung im murinen Modell der FeCl₃-induzierten venösen Thrombose antithrombotisch wirkt, ohne das Blutungsrisiko zu erhöhen.

Als weiteres Modell für eine venöse Thrombose wurde in der vorliegenden Arbeit ein Modell der Stase-induzierten Thrombose im Kaninchen untersucht. Dieses Modell basiert auf einem Stase-induzierten Thrombosemodell nach Wessler und wurde für die hier durchgeführten Studien modifiziert (Kap. 3.2.1) [Gitel SN et al. 1979]. Das Stase-Modell entspricht physiologisch am ehesten einer venösen Thrombose durch eine funktionelle Stase des Blutes, zum Beispiel durch Langstreckenflügen oder Bettlägerigkeit. Mittels einer Ligatur der *V. jugularis* wurde hier für 180 min eine vollständige Stase des Blutes induziert und anschließend das Thrombusgewicht ausgewertet (Kap. 4.2.1). Im Gegensatz zur protektiven Wirksamkeit der FXII-Inhibition im murinen Modell der FeCl₃-induzierten Thrombose konnte im Stase-induzierten venösen Thrombosemodell im Kaninchen keine Veränderung des Thrombusgewichts unter anti-FXIIa MAb 3F7-Behandlung gezeigt werden. Diese Beobachtung war überraschend, da zuvor bei der Behandlung mit dem rHA-Infestin-4 ein signifikant reduziertes Thrombusgewicht im gleichen Modell beobachtet worden war [May F et al. 2013].

Um auszuschließen, dass die FXIIa-Hemmung mittels rHA-Infestin-4 durch eine beschleunigte Thrombusretraktion das Thrombusgewicht der Vorversuche reduziert war, wurde in der vorliegenden Arbeit außerdem der Clot-Retraktions-Tests durchgeführt (Kap. 4.2.3). *In vitro* konnte auf thrombozytärer Ebene keine Veränderung der Clot-Retraktion unter Einfluss der FXIIa-Inhibitoren beobachtet werden. Das reduzierte Thrombusgewicht im Stase-induzierten Thrombosemodell beruht also sehr wahrscheinlich auch *in vivo* auf einem defekten dreidimensionalen Thrombuswachstum. Weiterhin verdeutlicht diese Beobachtung, dass die Plättchen-Aggregation bei ausreichender Thrombinmenge unabhängig von einer FXII-Aktivierung bzw. -Inhibition abläuft.

Die Abweichung zwischen der Thrombusmasse bei rHA-Infestin-4 und anti-FXIIa MAb 3F7 liegt sehr wahrscheinlich nicht in einer unzureichenden Dosierung des FXIIa-Inhibitors, da über den Anstieg der aPTT die Inhibition von FXIIa nachgewiesen wurde. Zusätzlich konnte im simultanen Thrombosemodell (Kaninchen) im gleichen Tier die FeCl₃-induzierte Thrombose durch den anti-FXIIa MAb 3F7 verhindert wurde. Möglicherweise könnte das unveränderte venöse Thrombusgewicht durch die hohe Affinität des anti-FXIIa MAb 3F7 gegen den humanen FXIIa begründet sein, wodurch eventuell nicht alle Formen des Kaninchen-FXIIa vollständig inhibiert wurden. Jedoch konnte in internen Vorstudien der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der anti-FXIIa MAb 3F7 auch in Kaninchenplasma mit hoher Affinität an FXIIa bindet und ihn so inhibiert. Zum Anderen könnte ein Unterschied in der Wirkungsweise der beiden spezifischen FXIIa-Inhibitoren ein verändertes Thrombusgewicht verursacht haben, denn der rHA-Infestin-4 inhibiert außer FXII im massiven Überschuss auch FXa und Plasmin [Hagedorn I et al. 2010]. Möglicherweise ist die Bindung von rHA-Infestin-4 an den Kaninchen FXIIa auch potenter und/oder permanent, im Vergleich zur Bindung über den anti-FXIIa MAb 3F7.

In Studien mit FXII-K.O.-Mäusen wurde gezeigt, dass die Abwesenheit von FXII die Thrombusbildung unter arteriellen Strömungsbedingungen negativ beeinflusst [Renné T et al. 2005]. Diese Hypothese wird unterstützt durch die protektive Wirkung der anti-FXIIa MAb 3F7-Behandlung im FeCl₃-induzierten arteriellen Thrombose-Modells (Kaninchen) in der vorliegenden Arbeit (Kap. 4.2.1). Jedoch unterscheiden sich die thrombotischen Reaktionen im arteriellen System von denen im venösen System. Renné et al. postulierten die Hypothese, dass unter arteriellen Flussbedingungen die Aktivierung von FXII zu einer supplementierenden Thrombinbildung führt, wodurch ein muraler, Plättchen-reicher Thrombus gebildet wird [Lippi G et al. 2011; Renné T et al. 2005]. Die unter venösen Bedingungen gebildeten Thromben durch Blutstase oder -Stenose sind dagegen reich an Erythrozyten, Fibrin und Leukozyten [Wakefield TW et al. 1995]. Ein weiterer Unterschied der beiden Thromboseformen ist die lokale Ankonzentrierung der Gerinnungsfaktoren unter den langsameren venösen Strömungsbedingungen [Previtali E et al. 2011].

Diese Differenzen in der Thrombusbildung und -Zusammensetzung führen zu der Frage, welche Rolle die FXIIa-vermittelte Thrombinbildung in der venösen Thrombose spielt. Obwohl Renné et al. in einem Modell der letalen pulmonalen Lungenembolie als Modell für eine venöse Thrombose in FXII-K.O.-Mäusen einen moderaten Schutz in Abwesenheit von FXII beobachtet hatten, ist dieses Modell kritisch zu betrachten [Renné T et al. 2005]. Die Einleitung der Lungenembolie mittels Adrenalin und Kollagen in diesem Modell entspricht nicht den (patho-) physiologischen Bedingungen, die zu einer

Lungenembolie führen. Daher ist zwar möglich, dass die Abwesenheit von FXII unter den gewählten Umständen in den FXII-K.O.-Mäusen bei Renné et al. protektiv wirkt. Jedoch könnte der Beitrag von FXIIa unter den normalen Bedingungen zur venösen Thrombose und einer Lungenembolie von seiner Funktion im artifiziellen Lungenembolie-Modell abweichen.

Eine weitere Studie zur Untersuchung der Rolle von FXII in der venösen Thrombose wurde von Revenko et al. durchgeführt. Anders als in dem verwendeten reinen Stase-Modell der vorliegenden Arbeit (Kap. 4.2.1) wurde hier eine Reduzierung des Blutflusses (Stenose) durch die *V. cava caudalis* in Mäusen vorgenommen. Gleichzeitig wurde durch eine Endothelverletzung der thrombotische Stimulus ergänzt. Mittels der Antisense-Oligonucleotid-Technik wurde eine FXII-Defizienz herbeigeführt, wodurch das FXII-Zymogen im Plasma depletiert wurde [Revenko AS et al. 2011]. Es konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von FXII in diesem Stenose-induzierten venösen Thrombosemodell zu einer Reduzierung der Thrombusmasse führte. Hierbei ist der Unterschied zwischen einer Stenose mit einem residualen Blutfluss, und einer kompletten Blutstase zu betonen. Die protektive Wirksamkeit der FXII-Depletion bei Revenko et al. ist also nur teilweise vergleichbar zur Beobachtung der vorliegenden Arbeit, wo unter Stase-Bedingungen im Kaninchen nach anti-FXIIa MAb 3F7-Behandlung kein protektiver Effekt auf das Thrombusgewicht festgestellt wurde.

Möglicherweise lassen sich die abweichenden Beobachtungen durch die Unterschiede in den jeweils verwendeten Modellen erklären. Diese liegen in der Untersuchung der Spezies (Maus versus Kaninchen, unterschiedlichen Blutflussgeschwindigkeiten (Stase versus Stenose) und im Ansatz der FXII(a)-Inhibition. Revenko et al. depletierten auf Expressionsebene das Zymogen FXII, wohingegen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten FXIIa-Inhibitoren gegen die aktive, im Blut zirkulierende Form FXIIa wirken und außerdem gegen den humanen FXIIa entwickelt worden sind.

Bei Revenko et al. wurde zwar die effektive Hemmung von FXII(a) kontrolliert, jedoch konnte eine residuale FXII-Aktivität nicht vollständig ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass für die vorliegende Arbeit im Kaninchenmodell der simultanen Thrombose (Kap. 4.2.1) unter anti-FXIIa MAb 3F7-Behandlung einerseits arteriell ein deutlicher antithrombotischer Schutz bestand. Andererseits konnte dieser jedoch unter venöser Stase im gleichen Tier nicht bestätigt werden. Außerdem wurde bei Revenko et al. zusätzlich eine Endothelverletzung mit der Freilegung subendothelialer Matrix induziert, um die Thrombose einzuleiten [Revenko AS et al. 2011].

Da FXII auch durch Kollagen aus dem Subendothel aktiviert werden kann, könnte dies eine Ursache für die reduzierte Thrombengröße in den FXII-depletierten Mäusen sein. Denn in dem Fall entstünde

der resultierende Thrombus in den Kontrolltieren aus komplexeren Reaktionen, induziert durch Stenose mit einer Gefäßverletzung und unter Beteiligung von FXIIa.

Letztendlich deuten die Beobachtungen darauf hin, dass die Prozesse der Koagulation und Thrombusbildung zu großen Teilen abhängig sind von verschiedenen Randbedingungen. Nur so lässt sich ein Erklärungsansatz finden, der die Separierung von Thrombose und Hämostase beinhaltet sowie den Beitrag von FXIIa zur arteriellen Thrombose, da FXIIa eher eine untergeordnete Rolle bei einer Stase-induzierten Thrombose zu spielen scheint.

Die Ergebnisse von von Brühl et al. untermauern die Hypothese, dass FXIIa in einem Stenose-induzierten murinen Thrombosemodell zu einer Thrombusbildung beiträgt [von Brühl ML et al. 2012]. In den Kontrollen (FXII-K.O. bzw. mit PCK-behandelte Mäuse) wurde eine reduzierte Thrombusbildung gefunden. Daraus schlossen von Brühl et al., dass die NETose eine FXIIa-abhängige Thrombinbildung initiiert. Während der NETose binden vor allem neutrophile Granulozyten an P-Selektin des aktivierten Endothels. Nach der Adhäsion und Aktivierung dieser Leukozyten setzen die Monozyten TF frei. Dabei scheint TF in diesem Zusammenhang hauptsächlich für die Einleitung der Immunzell-vermittelten Thrombose eine Rolle zu spielen. Außer der Leukozyten-Aktivierung konnten von Brühl et al. auch eine Plättchen-Adhäsion beobachten, die jedoch nicht wie in der arteriellen Thrombose innerhalb weniger Minuten zu massiven thrombozytären Aggregaten führte [Massberg S et al. 2010; von Brühl ML et al. 2012].

Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Rolle von FXIIa bei der Bildung eines venösen Thrombus abhängig ist vom Gerinnungsauslöser und den Begleitumständen, wie ein residualer Blutfluss. Die Tatsache, dass auch John Hageman an einer Lungenembolie verstarb, weist darauf hin, dass ein chronischer FXII-Mangel nicht vor einer venösen Thrombose schützt. Lange Zeit wurde deswegen eine FXII-Defizienz mit einem erhöhten thromboembolischen Risiko assoziiert [Halbmayer WM et al. 1992]. Eine kritische Überprüfung der Datensätze ergab jedoch Hinweise auf zusätzliche prothrombotische Risikofaktoren, die potenziell die thrombotischen Ereignisse ausgelöst haben könnten [Giolami A et al. 2004; Zeerleder S et al. 1999]. Im Fall von John Hageman ging der Lungenembolie beispielsweise eine mehrtägige Bettruhe voraus, da er nach einer Hüftfraktur bettlägerig war. Daher besteht der Disput weiter, ob ein reduzierter FXII-Spiegel im Plasma von Patienten das Risiko einer Thrombose erhöht und die Fibrinolyse beeinträchtigt.

In einer Studie von Endler et al. wurden Individuen mit unterschiedlich ausgeprägter FXII-Defizienz untersucht [Endler G et al. 2007]. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass die Mortalität

von Individuen mit normalem FXII-Level (100 %) und bei einer schweren FXII-Defizienz (< 10 %) vergleichbar zur allgemeinen Sterblichkeitsrate war. Dahingegen zeigte sich bei einer reduzierten FXII-Expression (10 - 30 % der Norm) ein vierfach erhöhtes Mortalitätsrisiko, unabhängig von der Todesart. Endler et al. vermuteten daraufhin, dass in der Gruppe mit > 10 % plasmatischem FXII eine erhöhte prokoagulante Aktivität mit einer Erhöhung des thrombotischen Potenzials einhergeht. Dahingegen resultiert eine schwere FXII-Defizienz (< 10 %) in einer Abnahme der prokoagulanten und fibrinolytischen Aktivität, was möglicherweise die normale Sterblichkeitsrate der Gruppe mit schwerer FXII-Defizienz bedingt [Endler G et al. 2007]. Die von Endler et al. beschriebene U-förmige Beziehung zwischen dem FXII-Plasmaspiegel und genereller Mortalität deutet darauf hin, dass auch bei einer pharmakologischen FXIIa-Inhibition der größte protektive Effekt bei einer vollständigen Hemmung des plasmatischen FXIIa zu erwarten ist. Für die vorliegende Arbeit wurden in den einzelnen Studien standardisiert Dosierungen des anti-FXIIa MAbs 3F7 gewählt, die zuvor in *in vitro*-Tests jeweils im Plasma von Mäusen und Kaninchen zu einer vollständigen FXIIa-Inhibition geführt hatte. Zudem konnte im Kaninchenmodell der venösen Stase-induzierten Thrombose die wirksame FXIIa-Inhibition durch Plasmatests zu verschiedenen Zeitpunkten bestätigt werden (Kap. 4.2.1).

Letztendlich kann spekuliert werden, dass eine selektive Hemmung des FXIIa bei einer vollständigen Blutstase keinen weiteren Vorteil bringt, weil die Thrombose vermutlich nicht allein durch die Reaktionen der intrinsischen Gerinnung eingeleitet und aufrecht erhalten wird. Da jedoch im Ligaturmodell eine protektive Wirksamkeit durch eine FXIIa-Inhibition gezeigt werden konnte, scheint FXIIa unter den residualen Flussbedingungen einer Stenose zur Thrombusbildung beizutragen.

5.3 FXIIa-Inhibition bei Kontaktaktivierung an Fremdoberflächen

Da Blut durch Kontakt zu Fremdoberflächen gerinnt, wurden seit 1979 diesbezüglich verschiedene Materialien auf ihre Thrombogenität untersucht [Grosse-Siestrup C et al. 1979; Ihlenfeld JV et al. 1979; Vale BH et al. 1982]. Als Modell wurde schon früh ein arteriovenöser (A/V) Shunt unter anderem in Kälbern, Hunden und Schafen getestet. Häufig wurde in diesen Studien eine Plättchen-Adhäsion beobachtet, die die meisten Autoren jedoch nicht mit einer Aktivierung des KPS in Verbindung brachten. Dass die FXII-Aktivierung hierbei der zugrunde liegende Mechanismus für eine Fremdoberflächen-induzierte Thrombose ist, wurde erst vor wenigen Jahren beschrieben [Sanchez J et al. 2008; Zhuo R et al. 2006]. In der klinischen Anwendung spielt die Fremdoberflächen-induzierte

Thrombose besonders bei intravasalen Prothesen und während einer ECMO-Anwendung oder eines kardiopulmonalen Bypasses eine große Rolle.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der A/V Shunt als Modell gewählt, um eine Fremdoberflächen-induzierte Thrombose einzuleiten und zu untersuchen. Das Modell bietet optimale Voraussetzungen, um die antithrombotische Kapazität einer spezifischen FXIIa-Inhibition unter nahezu arteriellen Strömungsbedingungen zu evaluieren. Als prokoagulante Oberfläche diente hier ein Glaselement, das über einen venösen und einen arteriellen Katheter mit dem zirkulierenden Blut in Kontakt gebracht wurde. Im murinen Modell des A/V Shunts wurden zunächst die beiden FXIIa-Inhibitoren rHA-Infestin-4 und anti-FXIIa MAb 3F7 untersucht (Kap. 4.1.3).

Die Behandlung mit rHA-Infestin-4 resultierte in einem zuverlässigen Schutz vor einer Fremdoberflächen-induzierten Thrombose über den gesamten Beobachtungszeitraum. In keinem der behandelten Tiere zeigte sich ein Hinweis auf ein thrombotisches Ereignis. Vergleichbar dazu wurde eine protektive Wirksamkeit des anti-FXIIa MAb 3F7 festgestellt, da 80 % der Tiere vor einer thrombotischen Okklusion geschützt waren. Jedoch wurde unter anti-FXIIa MAb 3F7-Behandlung in einigen Glaselementen eine dünne Schicht thrombotischen Materials gefunden, was bei rHA-Infestin-4 nicht beobachtet worden war. Diese dünne Schicht bestand vermutlich aus einer Plättchen-Ablagerung, die trotz einer FXII-Defizienz oder bei einer FXIIa-Inhibition auch durch andere Gruppen beobachtet werden konnte [Matafanov A et al. 2014; Renné T et al. 2005; Revenko AS et al. 2011; Tucker EI et al. 2012].

Da bei einer Behandlung mit rHA-Infestin-4 keine solchen Ablagerungen beobachtet wurden, deutet möglicherweise auf eine potentere Wirksamkeit von rHA-Infestin-4 hin. Möglicherweise könnte der Unterschied in der antithrombotischen Effizienz auch in einer niedrigeren Affinität des anti-FXIIa MAb 3F7 gegen den murinen FXIIa begründet sein, da er gegen die humane Form entwickelt wurde. Im Wesentlichen untermauern die Beobachtungen die postulierte FXIIa-Funktion, wonach die besondere Rolle von FXII in einer Amplifizierung der Thrombinbildung besteht. Aktivierte Plättchen, negativ geladene Oberflächen und auch Mikropartikel dienen als Oberfläche für die Ankonzentrierung und (Auto-)Aktivierung von FXII, der über die intrinsische Gerinnung sowohl die Thrombinbildung als auch die Anlagerung und Aktivierung weiterer Plättchen vermittelt [Renné T et al. 2005; van der Meijden PE et al. 2009].

Konsistent zur protektiven Wirksamkeit der FXIIa-Inhibition im murinen Modell sind die Beobachtungen der FXIIa-Inhibition im Kaninchen-Modell des A/V Shunts (Kap. 4.2.2). Im Rahmen der vor-

liegenden Arbeit wurde in dem Modell die antithrombotische Wirksamkeit des anti-FXIIa MAb 3F7 evaluiert. Es wurde beobachtet, dass alle Tiere der FXIIa-INH-Gruppe vergleichbar zur Heparin-behandelten Gruppe vor einer thrombotischen Okklusion geschützt waren. In einem Tier wurde jedoch eine geringe Menge thrombotisches Material im Glaselement gefunden. Diese Beobachtung passt zu den im murinen Modell gefundenen Ablagerungen und lässt sich ebenfalls dadurch erklären, dass FXIIa keine Rolle bei der initialen Plättchen-Adhäsion spielt [Matafanov A et al. 2014; Renné T et al. 2005; Revenko AS et al. 2011; Tucker EI et al. 2012]. Dass generell in den Glaselementen der Kaninchen-Studie nur bei einem Tier wenig thrombotisches Material gefunden wurde, könnte außerdem an dem höheren Blutvolumenstrom im A/V Shunt des Kaninchens im Vergleich zur Maus liegen, denn im Verhältnis wurde der Blutfluss in der Maus physikalisch stärkeren Turbulenzen ausgesetzt und massiver verlangsamt. Weiterhin konnte durch parallel durchgeführte Tests wie der Ohrblutungszeit keine Beeinträchtigung der hämostatische Kapazität durch den anti-FXIIa MAb 3F7 nachgewiesen werden. Dies steht im Kontrast zur erhöhten Blutungsneigung nach einer Heparin-Behandlung.

In einer weiteren internen Studie wurde rHA-Infestin-4 in dem gleichen Kaninchen-Modell getestet [May F et al. 2014]. Auch hier wurde beobachtet, dass der FXIIa-INH zuverlässig vor einer Fremdoberflächen-induzierten okklusiven Thrombose des A/V Shunts schützte, ohne sich bemerkbar auf die physiologische Hämostase auszuwirken. Wie auch im murinen Modell deutet dies auf die tragende Rolle der FXII-vermittelten Thrombinbildung hin.

Diese These wird außerdem durch Belege aus der Literatur unterstützt. Cheng et al. untersuchten in einem Pavian-Modell die FXII-vermittelte Aktivierung der intrinsischen Gerinnung [Cheng Q et al. 2010]. Die Gruppe nutzte dafür einen mit Kollagen beschichteten A/V Shunt und inhibierte die FXII-bindende Domäne des Substrats FXI mit einem Antikörper [Gailani D et al. 1997]. Mittels *in vivo*-bildgebender Verfahren konnten Cheng et al. nachweisen, dass die Hemmung der intrinsischen Koagulation keine Auswirkung auf die initiale Plättchen-Adhäsion ausübte. Des Weiteren wurde eine defekte Thrombusbildung beobachtet, die mit einer deutlich reduzierten Fibrinablagerung im A/V Shunt einherging. Ein wichtiger Unterschied zwischen dem A/V Shunt-Modell von Cheng et al. und dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell ist die Kollagen-Beschichtung des A/V Shunts durch erstere. Kollagen wirkt nicht nur als Aktivator von FXII, sondern wirkt außerdem direkt aktivierend auf Plättchen [Nieswandt B et al. 2002]. Dieser Mechanismus trägt vermutlich zusätzlich dazu bei, dass Cheng et al. in allen Tieren eine initiale Plättchen-Adhäsion beobachten konnten und die FXIIa-vermittelte Hemmung der intrinsischen Gerinnung in einer reduzierten Fibrin-Ablagerung um 40 %

resultierte [Cheng Q et al. 2010]. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit nur bei einem Kaninchen ein sehr kleiner Thrombus nach Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 im Glaselement des A/V Shunts gefunden.

Ergänzend zu der Studie von Cheng et al. wurde in der gleichen Arbeitsgruppe eine weitere Studie mit zwei direkt gegen FXII gerichteten monoklonalen Antikörpern im Kollagen-beschichteten A/V Shunt-Modell im Pavian durchgeführt [Matafonov A et al. 2014]. Die verwendeten Antikörper waren gegen die schwere Kette des Zymogens von FXII gerichtet, wodurch die Umwandlung zur aktiven Protease FXIIa gehemmt wurde. Kongruent zu den früheren Beobachtungen bewirkte die direkte FXIIa-Inhibition eine um 70 % reduzierte Fibrinablagerung im A/V Shunt. Dennoch wurde keine Reduzierung der initialen Plättchen-Adhäsion beobachtet. Durch die Kollagen-Beschichtung des A/V Shunts wurde jedoch auch hier ein stärkerer prothrombotischer Reiz gesetzt, als durch das unbehandelte Glaselement aus den Studien der vorliegenden Arbeit.

Der in der vorliegenden Arbeit getestete anti-FXIIa MAb 3F7 wurde außerdem durch Larsson et al. in einem ECMO-Modell im Kaninchen untersucht, um die klinische Relevanz einer FXIIa-Inhibition tiefer zu erforschen [Larsson M et al. 2014]. Die ECMO-Studie wurde über eine Dauer von 6 h durchgeführt. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der FXIIa-INH dabei ebenso zuverlässig vor einer Thrombose schützte, wie Heparin in der Kontrollgruppe. Die Messung der Fibrinablagerung ergab eine deutliche Reduktion und keine Differenz zwischen der anti-FXIIa MAb 3F7- und der Heparin-Gruppe. Ein wichtiger Unterschied bestand jedoch darin, dass für die FXIIa-INH-Gruppe keine Beeinträchtigung der Hämostase beobachtet wurde, in der Heparin-Gruppe dagegen eine deutliche Blutungsneigung. Als Test wurde dafür der Nagelhaut-Blutungstest verwendet. Diese Resultate vertiefen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten und unterstützen damit die Hypothese der nebenwirkungsarmen Antithrombose mittels FXIIa-Inhibition bei einer Fremdoberflächen-induzierten Gerinnungsaktivierung.

Zusammengenommen verdichten sich die Hinweise, dass FXIIa für die Thrombinbildung in der Initiationsphase eine untergeordnete Rolle spielt. Dieses Prinzip wurde in verschiedenen Spezies bestätigt, daher ist anzunehmen, dass auch im Menschen die Aktivierung von FXII erst in der Propagationsphase und bei einer Fremdoberflächen-Aktivierung für eine stabile Thrombose obligat ist. Durch spezifische FXIIa-Hemmung besteht die Option das Thrombuswachstum in der Propagationsphase zu limitieren, ohne gleichzeitig das Risiko einer Blutung zu erhöhen. Aus klinischer Sicht wäre

daher eine Antithrombose mittels FXIIa-Inhibition vor allem bei kardiovaskulären Stents, während einer ECMO-Anwendung oder eines kardiopulmonalen Bypasses vorteilhaft.

5.4 FXIIa-Inhibition im experimentellen Schlaganfall

Nach einem ischämischen Schlaganfall mit Rekanalisation werden durch die wieder hergestellte Durchblutung paradoxerweise Reperfusionsschäden eingeleitet. Diese beinhalten unter anderem die Entstehung von Mikrothromben und die Forcierung pro-inflammatorischer Prozesse. Letztendlich wird dadurch die Ausbreitung der Penumbra gefördert. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass eine FXII-Aktivierung die Reperfusionsschäden vorantreibt, wohingegen FXII-defiziente Mäuse geringere neurofunktionelle Defizite aufwiesen [Kleinschnitz et al. 2006; Pham M et al. 2010]. Daher war ein Projekt der vorliegenden Arbeit die neuroprotektive Wirksamkeit der FXIIa-Inhibition im murinen Schlaganfallmodell unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen.

Es wurde das weit verbreitete transiente Fadenmodell zur Einleitung eines experimentellen Schlaganfalls in der Maus angewandt [Engel O et al. 2011]. Dabei wurde die Ischämie auf einen Zeitraum von 60 min begrenzt, um einerseits das Krankheitsbild im Menschen mit Reperfusion nach einer spontanen oder pharmakologischen Rekanalisation zu simulieren. Andererseits bietet die 60-minütige Ischämie-Phase den Vorteil, dass die Mäuse deutlich erkennbar neuromotorische Schäden als Folge der Ischämie zeigen. Gleichzeitig wird damit ein potentielles Wirkungsfenster zur Untersuchung von neuen neuroprotektiven Therapieansätzen eröffnet.

Bisher konnte in FXII-K.O.-Mäusen ein neuroprotektiver Effekt durch die Abwesenheit von FXII demonstriert werden [Kleinschnitz C et al. 2006]. Außerdem wurde die protektive Wirksamkeit einer FXII-Defizienz durch eine pharmakologischen FXIIa-Inhibition mittels rHA-Infestin-4 und PCK bestätigt [Hagedorn I et al. 2010; Kleinschnitz C et al. 2006]. Darauf basierend wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Studien in dem gleichen murinen tMCAO-Modell durchgeführt. Als Arbeitshypothese wurde angenommen, dass die Inhibition von FXIIa in einer verbesserten Reperfusion resultiert und damit die Ausbreitung des Infarktkerns limitiert. Darüber hinaus bietet dieser Ansatz den großen Vorteil, dass eine FXIIa-Inhibition nicht mit einem erhöhten Risiko für Blutungskomplikationen wie eine ICH assoziiert wird. Folglich könnten letztendlich auch Schlaganfall-Patienten von einer spezifischen FXIIa-Hemmung profitieren.

Dafür wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst der anti-FXIIa MAb 3F7 in einem prophylaktischen Behandlungsansatz im tMCAO-Modell untersucht (Kap. 4.3.1 und 4.3.2). Außerdem wurde ergänzend

zu der Studie von Hagedorn et al. in der vorliegenden Arbeit der spezifische FXIIa-INH rHA-Infestin-4 in einem therapeutischen Behandlungsansatz evaluiert (Kap. 4.3.3).

Prophylaktischer Behandlungsansatz mit anti-FXIIa MAb 3F7

In der vorliegenden Arbeit konnte unter der Behandlung von anti-FXIIa MAb 3F7 (25 mg/kg) eine signifikante Verbesserung der neurofunktionalen Defizite (Bederson Score und Grip Test) sowie eine signifikante Reduzierung des Infarktkerngebietes nachgewiesen werden (Kap. 4.3.1). Weiterhin konnte für eine drastisch reduzierte Mortalität beobachtet werden. Da die Dosierung 10 mg/kg anti-FXIIa MAb 3F7 keine signifikante Verbesserung im Vergleich zur Positivkontrolle ergab, kann dies als Hinweis auf einen Dosis-abhängigen Therapieerfolg gewertet werden. Die neuroprotektive Wirksamkeit ließ sich jedoch durch eine Erhöhung der Dosis auf 50 mg/kg nicht zusätzlich steigern.

Makroskopisch wurde kein Hinweis auf eine erhöhte Blutungsneigung während des chirurgischen Eingriffs oder auf ein erhöhtes Risiko der ICH in den FXIIa-INH-behandelten Gruppen gefunden. Dies weist darauf hin, dass eine pharmakologische FXIIa-Inhibition das Potenzial zu einer optimierten Schlaganfalltherapie besitzt. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate von Kleinschnitz et al., die in FXII-K.O.-Mäusen und unter PCK-Behandlung eine deutlich signifikante Verbesserung der klinischen Defizite und des Infarktvolumens beobachten konnten [Kleinschnitz C et al. 2006].

Dass die Erhöhung der Dosis keine weitere Verbesserung ergab, könnte in der hohen Affinität des anti-FXIIa MAb 3F7-Antikörpers gegen den humanen FXIIa begründet sein. Wie in den Thrombosemodellen bereits erwähnt, werden vermutlich einige Formen des murinen FXIIa durch den monoklonalen Antikörper nicht inhibiert. Damit ließe sich die U-förmige Konzentrations-Wirkungs-Beziehung zwischen anti-FXIIa MAb 3F7-Dosis und dem neuroprotektiven Effekt erklären. Es wurde jedoch im Plasma aller FXIIa-INH-Gruppen eine verlängerte aPTT und eine markant reduzierte FXIIa-Aktivität beobachtet. Das spricht dafür, dass der anti-FXIIa MAb 3F7 systemisch im Plasma verteilt war.

Weiterhin konnten die Resultate von Hagedorn et al. bestätigt werden, die das Fusionsprotein rHA-Infestin-4 in dem gleichen murinen tMCAO-Modell in einem prophylaktischen Ansatz untersucht hatten. Unter rHA-Infestin-4-Behandlung wurde eine signifikante Verbesserungen des Infarktvolumens und der klinischen Symptome durch die prophylaktische FXIIa-Inhibition beobachtet [Hagedorn I et al. 2010].

Zusätzlich zur Auswertung der neurofunktionellen Defizite und der Infarktvolumetrie wurde in der vorliegenden Arbeit eine dosisabhängige, signifikante Verringerung von Fibrin(-ogen) auf Protein-

ebene unter FXIIa-Inhibition (25 mg/kg) im Bereich der Penumbra beobachtet (Kap. 4.3.1). Das unterstützt die Annahme, dass die Aktivierung von FXII die Reperfusion-induzierte Mikrothrombose vorantreibt und damit zur Ausbreitung des Infarktkerns beiträgt. Demzufolge kann eine FXIIa-Inhibition die Thrombusbildung reduzieren, was wahrscheinlich zu einer verringerten Fibrin(-ogen)-Dichte in der ischämischen Hemisphäre führt. Kongruent zu dieser Beobachtung wurde von Kleinschnitz et al. histologisch eine Fibrinablagerung in der Mikrovaskulatur des Endothels als Folge einer Ischämie nachgewiesen [Kleinschnitz C et al. 2006].

Zur Evaluation der inflammatorischen Reaktionen wurde außerdem die mRNA-Expression der Zytokine IL-1 β , TNF- α und TGF- β bestimmt. Zusätzlich wurde die Expression von Endothelin-1 als Biomarker für die gestörte BHS-Funktion auf mRNA-Ebene gemessen. Die Analyse der gewählten Biomarker ergab besonders für die Dosierung anti-FXIIa MAb 3F7(25 mg/kg) im ischämischen Cortex eine signifikante Verbesserung im Vergleich zur Positivkontrollgruppe. Im Detail wurde eine Verringerung der Zytokin-Level von der IL-1 β und TNF- α beobachtet (Kap. 4.3.1), was auf reduzierte inflammatorische Reaktion nach Ischämie hindeutet. Darüber hinaus konnte im Vergleich zur Positivkontrolle eine reduzierte Endothelin-1-Expression festgestellt werden, was auf eine Verbesserung der BHS-Dysfunktion nach der Ischämie hindeutet.

Bei der Analyse der IL-1 β -Expression fiel auf, dass die naiven Tiere sowohl im Cortex als auch in den Basalganglien einen erhöhten Wert von etwa 10 AU aufwiesen (Abb. 27 A, B). Dies war überraschend, da diese Tiere ja unbehandelt als Negativkontrolle mitgeführt wurden. Möglicherweise waren sie einem erhöhten Stresspegel ausgesetzt, was sich jedoch nicht auf die Werte der anderen untersuchten Biomarker auszuwirken schien.

Im Einklang zu einer verringerten inflammatorischen Reaktion konnte auch für das Entzündungsmodulierende TGF- β eine verminderte Expression nachgewiesen werden. Das ist kongruent zu Beobachtungen von Krupinski et al., die bei der Untersuchung von Hirnproben aus Patienten mit ischämischem Schlaganfall die höchste TGF- β -Konzentration in der Penumbra auffinden konnten, im Vergleich zum Infarktkern und im Gewebe der contralateralen Hemisphäre [Krupinski J et al. 1996]. Die Gruppe schloss daraus, dass die erhöhte TGF- β Expression im Rahmen einer Angiogenese zur Restrukturierung des Infarktvolumens beiträgt. Möglicherweise kann die Reduzierung der TGF- β Expression auch im Zusammenhang mit dem reduzierten Infarktvolumen betrachtet werden. In dem Fall würde durch das kleinere ischämische Areal insgesamt auch weniger TGF- β zur Restrukturierung benötigt.

Im Einklang mit den murinen Daten der vorliegenden Arbeit wurde in einem Rattenmodell des experimentellen Schlaganfalls eine reduzierte TGF- β Expression beobachtet [Sehara Y et al. 2007]. Die Versuchstiere waren bei der Reperfusion mit granulozytärem *Colony-stimulating factor* (G-CSF) behandelt worden. Daher schrieb die Arbeitsgruppe die reduzierte Expression des Ischämie-typischen Zytokin-Profiles einem Behandlungserfolg zu. Denkbar wäre jedoch auch, dass G-CSF nicht allein modulierend auf die Zytokin-Expression wirkt, sondern auch auf anderen Ebenen zur Reduzierung des infarzierten Areals beiträgt. In diesem Fall wäre auch das Volumen der Penumbra verringert, was anteilig zu einer geringeren Menge an TGF- β führte. Im Falle der prophylaktischen FXIIa-Inhibition ließe sich die verringerte mRNA-Expression von TGF- β auf diese Weise erklären.

Die Rolle von TNF- α bei zerebralen Schädigungen ist nicht vollständig geklärt. Es gibt einerseits Hinweise darauf, dass eine Hochregulation von TNF- α mit dem Untergang neuronaler Zellen nach experimentellem Schlaganfall einhergeht [Barone FC et al. 1997]. Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen auf eine Hochregulation von TNF- α hin, die in der Penumbra und unter FXIIa-INH-Behandlung verglichen mit der Positivkontrollgruppe besonders ausgeprägt ist (Kap. 4.3.1). Im Widerspruch zu diesem Resultat konnte in einem Rattenmodell ein reduziertes TNF- α Vorkommen immunhistochemisch beobachtet werden, was als ein Behandlungserfolg durch eine therapeutische G-CSF-Applikation gewertet wurde [Sehara Y et al. 2007]. Jedoch ist diese Schlussfolgerung kritisch zu betrachten, da die Resultate von Barone et al. auf Versuchen mit exogen appliziertem TNF- α basieren.

Dahingegen konnten mehrere Gruppen einen neuroprotektiven Effekt von endogenem TNF- α belegen, was im Einklang mit den Daten der vorliegenden Arbeit steht [Bruce AJ et al. 1996; Lambertsen KL et al. 2009]. Als möglicher Mechanismus wird diskutiert, dass mikroglialer TNF- α antioxidative Enzyme aktiviert, die nach einer Ischämie das Überleben von Neuronen fördern. Aus dieser Perspektive betrachtet könnte die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Hochregulation der TNF- α -Expression ein Hinweis auf ein verbessertes neuronales Überleben nach einer Ischämie sein.

Um die Integrität der BHS zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit außerdem der Biomarker Endothelin-1 (Edn-1) gemessen. Edn-1 ist ein potentes vasokonstriktives Peptid, welches in der akuten Phase nach einer zerebralen Ischämie vermehrt im Plasma und Liquor von Patienten nachgewiesen werden kann [Fagan SC et al. 2004; Franceschini R et al. 2001; Volpe M et al. 2000]. Neben den physiologischen Funktionen macht eine Ischämie-induzierte Hochregulation von Edn-1 die BHS permeabel [Dashwood MR et al. 2010; Macrae IM et al. 1993; Matsuo Y et al. 2001]. Dadurch wird eine Extravasation begünstigt, die wesentlich zur Ausbildung eines Ödems in der subakuten Phase des

Schlaganfalls beiträgt. Basierend auf der Annahme, dass sich eine FXIIa-Inhibition im murinen Modell auch protektiv auf eine Ödementwicklung auswirkt, wurde der mRNA-Gehalt von Edn-1 mittels RT-qPCR im Infarktkern und Cortex der ischämischen Hemisphäre bestimmt. Das Expressionsmuster für Edn-1 zeigte besonders im Cortex unter FXIIa-Inhibition ein dosisabhängig reduziertes Profil (Kap. 4.3.1). Das lässt darauf schließen, dass die Behandlung mit anti-FXIIa MAb 3F7 auch auf die Integrität der BHS im minderperfundierten Gewebe eine schützende Funktion ausübt. Ein möglicher Mechanismus hierfür ist die neuroprotektive Wirksamkeit der FXIIa-Inhibition, die das Infarktvolumen und eine BK-vermittelte inflammatorische Reaktion verringert. Die beobachtete reduzierte mRNA-Expression von Edn-1 der vorliegenden Arbeit steht außerdem im Einklang mit Daten von Matsuo et al., die im tMCAO-Modell einen protektiven Effekt durch Blockade des Endothelin-Rezeptors in Ratten demonstrieren konnten [Matsuo Y et al. 2001].

Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen also darauf hin, dass eine prophylaktische FXIIa-Inhibition mittels anti-FXIIa MAb 3F7 im murinen tMCAO-Modell über eine verbesserte Reperfusion und reduzierte Inflammation zu einer Verringerung der neurologischen Defizite führt. Dies ist kongruent zu einer weiteren tMCAO-Studie, in der der FXIIa-Inhibitor D-Pro-Phe-Arg Chloromethylketon (PCK) untersucht wurde [Kleinschnitz C et al. 2006, Tans G et al. 1987]. Die pharmakologische Hemmung von FXIIa durch PCK in einem prophylaktischen Ansatz resultierte in einer neuroprotektiven Wirksamkeit, vergleichbar zu den Daten der FXII-K.O.-Mäuse. Die Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus zeigte über bildgebende Verfahren (MRI), dass die FXII-defizienten Tiere eine verbesserte kortikale Reperfusion aufwiesen [Pham M et al. 2010]. Dies spricht für die Hypothese der vorliegenden Arbeit, dass ein spezifischer FXIIa-INH die sekundäre Thrombose verhindert und auf diese Weise die Penumbra vor einer Neurodegeneration geschützt wird.

Darüber hinaus wurde der selektive FXIIa-INH 3-Carboxamid-Courmarin („COU-254“) im gleichen experimentellen Schlaganfallmodell getestet, was widersprüchliche Daten lieferte. Die Bindung zwischen COU-254 und FXIIa bewirkt eine Acylierung anstatt einer Alkylierung der Protease, wodurch FXIIa proteolytisch inaktiv bleibt [Robert S et al. 2008]. Überraschenderweise wurde im Gegensatz zu den bis dahin publizierten Daten hier kein Hinweis auf eine COU-254-vermittelte Neuroprotektion beobachtet [Kraft P et al. 2010]. Da COU-254 zu Inhibition des humanen FXIIa entwickelt wurde, ist auch hier möglich, dass COU-254 eine geringere oder keine Affinität gegen den murinen FXIIa besitzt, vorausgesetzt COU-254 gelangt in einer wirksamen Konzentration ins murine Plasma. Denn im Gegensatz zur i.v.-Applikationsroute der vorliegenden Arbeit wurde die Testsubstanz bei Kraft et al. 2 h

vor Beginn der Ischämie i.p. verabreicht, da eine i. v.-Gabe von COU-254 mit einer akuten Vergiftungsreaktion und Mortalität assoziiert wird [Kraft P et al. 2010]. Obwohl beispielsweise für das Coumarin-Derivat Esculetin bei einer i.p.-Gabe ein neuroprotektiver Effekt im murinen tMCAO-Modell beobachtet wurde, könnte die modifizierte biochemische Struktur von COU-254 möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit haben [Wang C et al. 2012]. Darüber hinaus wurde von Kraft et al. auch die effektive FXIIa-Inhibition nicht durch einen zusätzlichen Blutungstest wie zum Beispiel eine aPTT untersucht. Daher ist möglich, dass die FXIIa-Inhibition bei Kraft et al. nur unvollständig gegeben war, was die unverändert schweren klinischen Symptome nach dem experimentellen Schlaganfall erklären könnte.

Geht man davon aus, dass die FXIIa-Inhibition im tMCAO-Modell über die Verringerung der thromboinflammatorischen Reaktionen zu einer verbesserten Reperfusion führt, spielt die antithrombotische Wirksamkeit hier eine tragende Rolle. Aus murinen Thrombose-Studien ist weiterhin bekannt, dass sich ein FXII-Mangel erst ab einer Verringerung des Zymogens auf weniger als 90 % des normalen Plasmaspiegels verlängernd auf die aPTT-Zeit und damit störend auf eine Thrombusbildung auswirkt [Revenko AS et al. 2011]. In diesem Zusammenhang ist der protektive Effekt der FXIIa-Hemmung, der in der vorliegenden Arbeit und bei Kleinschnitz et al., sowie Hagedorn et al. beobachtet wurde, vermutlich auf die vollständige Hemmung des plasmatischen FXIIa zurückzuführen. Dies steht im Einklang mit den Daten der prophylaktischen anti-FXIIa MAb 3F7-Behandlung (Kap. 4.3.1).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zerebrale Ischämie synchron ein großes Spektrum inflammatorischer, thrombotischer und Hypoxie-induzierter pathophysiologischen Prozesse einleitet. Aus den gesammelten Daten aller Studien ergibt sich ein Gesamtbild, welches auf die protektive Wirksamkeit einer prophylaktischen FXIIa-Inhibition im Krankheitsbild des ischämischen Schlaganfalls schließen lässt. Daher besitzt der Ansatz der pharmakologischen FXIIa-Inhibition ein großes anwendungsnahes Potenzial, insbesondere hinsichtlich der Reperfusionsschäden und einer durch rt-PA erhöhten Blutungsneigung als Komplikationen nach einem ischämischen Schlaganfall.

Therapeutischer Behandlungsansatz mit rHA-Infestin-4

Neben dem prophylaktischen Behandlungsansatz der FXIIa-Inhibition wurde für die vorliegende Arbeit außerdem ein therapeutischer Behandlungsansatz im tMCAO-Modell getestet (Kap. 4.3.3). Hierbei wurde als Ergänzung zu den Daten von Hagedorn et al. die FXIIa-Inhibition mittels rHA-Infestin-4 durchgeführt. Mit diesem FXIIa-INH war zuvor im prophylaktischen Behandlungsansatz eine

signifikante Verbesserung der neurologischen Defizite beobachtet worden, die sich auch in der Reduzierung des Infarktvolumens widerspiegelte [Hagedorn I et al. 2010]. Dies war kongruent zu Resultaten einer Studie mit FXII-defizienten Mäuse im experimentellen Schlaganfall [Kleinschnitz C et al. 2006]. Für die Studie der vorliegenden Arbeit erfolgte die Applikation von rHA-Infestin-4 (200 mg/kg) unmittelbar nach Beginn der Reperfusion (Kap. 4.3.3). Dementsprechend gelangte der FXIIa-Inhibitor erst kurz nach Einleitung der thrombo-inflammatorischen Reaktionen in das ischämische und minderperfundierte Gewebe. Überraschenderweise ergab die Beurteilung der neurologischen Defizite 24 h nach Reperfusion keinen Unterschied zur Kontrollgruppe, was sich auch in der Infarktvolumenmessung bestätigte.

Die relative Proteinmessung von Fibrin(-ogen) deutete nicht auf eine reduzierte Mikrothrombose durch die FXIIa-Inhibition nach Reperfusion hin. Dies steht im Widerspruch zu der Beobachtung, dass anti-FXIIa MAb 3F7 im prophylaktischen Behandlungsansatz die Fibrinablagerung reduzieren konnte (Kap. 4.3.1). Dennoch ließ das Expressionsprofil der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und noch deutlicher bei TNF- α auf eine abgeschwächte entzündliche Reaktion im Vergleich zur Kontrolle schließen. Diese Mediatoren vermitteln multiple inflammatorische Prozesse und auch den Ischämie-induzierten neuronalen Zelltod. Daher deuten die Daten der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass rHA-Infestin-4 auch in einem therapeutischen Behandlungsansatz anti-inflammatorisch wirksam ist. Es lässt sich spekulieren, dass dieser Effekt möglicherweise erst nach einer Reperfusionsperiode von länger als 24 h zu einer Neuroprotektion beiträgt. Im Gegensatz zur reduzierten inflammatorischen Reaktion wurde überraschenderweise eine hochregulierte Edn-1 mRNA-Expression detektiert. Die vermehrte Edn-1 Expression wird assoziiert mit einer BHS-Extravasation, die eine Ödementstehung fördert. Es wurde nicht untersucht, in wie weit dies eine Ödementstehung trotz einer Hemmung der FXII-vermittelten BK-Bildung als Folge der zerebralen Ischämie vorantreibt.

Vergleich der Faktor XIIa-Inhibitoren im murinen experimentellen Schlaganfall

Nachdem die Depletion von FXII im murinen Schlaganfallmodell einen deutlichen neuroprotektiven Effekt zur Folge hatte, stellte die Erforschung spezifisch wirksamer FXIIa-Inhibitoren den nächsten Schritt in der Entwicklung eines neuen Therapieansatzes dar [Kleinschnitz et al. 2006]. Üblicherweise wird im tMCAO-Modell zunächst die prophylaktische Wirksamkeit einer neuen Substanz getestet. Dies hat den Vorteil, dass die systemisch vorliegende Testsubstanz ihre Wirksamkeit ohne zeitliche Verzögerung schon bei Einleitung der Ischämie-induzierten Reaktionen entfalten kann. Mit dieser Vorgehensweise kann der maximale neuroprotektive Effekt einer Testsubstanz beurteilt werden, was

beispielsweise bei Untersuchung der Substanzen PCK und rHA-Infestin-4 zu vielversprechenden Resultaten führte [Hagedorn I et al. 2010; Kleinschnitz C et al. 2006]. Im folgenden Unterkapitel werden zunächst die prophylaktische und die therapeutische Behandlungsstrategie im tMCAO-Modell anhand der Resultate dieser Arbeit und mit aus der Literatur bekannten Daten verglichen. Im Anschluss daran werden die Eigenschaften von rHA-Infestin-4 und anti-FXIIa MAb 3F7 herausgestellt und in Bezug zu anderen FXIIa-INH gesetzt, für die bisher im murinen tMCAO-Modell eine protektive Wirksamkeit beobachtet wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der FXIIa-INH anti-FXIIa MAb 3F7 auf seine prophylaktische Wirksamkeit im murinen tMCAO-Modell unter aufsteigender Dosierung getestet (Kap. 4.3.1 und 4.3.2). Es wurde dabei beobachtet, dass sowohl die neurologischen Defizite als auch das Infarktvolumen in der FXIIa-INH-Gruppe reduziert waren. Das steht im Einklang zu den Daten von Hagedorn et al., die für rHA-Infestin-4 einen deutlichen neuroprotektiven Effekt und ein verringertes Infarktvolumen in dem gleichen Modell demonstrieren konnten [Hagedorn et al. 2010]. Ergänzend zu diesen Beobachtungen wurde in der vorliegenden Arbeit ein therapeutischer Behandlungsansatz mit rHA-Infestin-4 in der gleichen Dosierung und in dem gleichen Modell durchgeführt (Kap. 4.3.3).

Überraschenderweise resultierte die rHA-Infestin-4-Behandlung zum Zeitpunkt der Reperfusion in keiner Verbesserung der klinischen Symptomatik im Vergleich zu den Positivkontrollen. Darüber hinaus wurde keine Veränderung der Fibrin(-ogen)-Ablagerung in der ischämischen Hemisphäre beobachtet, verglichen mit der Positivkontrolle. Dies deutet darauf hin, dass die therapeutische Wirksamkeit von rHA-Infestin-4 nach der Einleitung der Ischämie-induzierten Reaktionen im untersuchten Zeitfenster von 24 h von einer prophylaktischen Substanzapplikation abweicht.

Mögliche Ursachen für die Differenz liegen vermutlich hauptsächlich im Zeitpunkt der Applikation, da in der prophylaktischen Applikation durch Hagedorn et al. bereits der protektive Effekt durch rHA-Infestin-4 demonstriert wurde [Hagedorn I et al. 2010]. Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit die wirksame FXIIa-Inhibition über eine verlängerte aPTT und einer reduzierten FXIIa-Aktivität im Plasma der FXIIa-INH Gruppe belegt werden. Daher scheint die FXIIa-Inhibition die größte neuroprotektive Wirksamkeit während der frühen Phase der Ischämie-induzierten pathophysiologischen Prozesse auszuüben. Denn wenn schon während der Ischämie ein massives prothrombotisches Potenzial im ZNS der Maus aufgebaut wurde, kann eine FXIIa-Hemmung zum Zeitpunkt der Reperfusion dies nicht mehr verhindern. Dafür spricht zum Beispiel, dass bisher mit der im prophylaktischen Ansatz getes-

teten Substanz PCK keine Studie veröffentlicht wurde, die einen neuroprotektiven Effekt im therapeutischen Behandlungsansatz in der Spezies Maus belegt [Kleinschnitz C et al. 2006].

Dem gegenüber stehen Studien, die bei einer therapeutischen Applikation von rHA-Infestin-4 in der Ratte eine protektive Wirksamkeit demonstrieren konnten [Krupka J et al. 2013]. Dabei bewirkt die therapeutische FXIIa-Inhibition sowohl eine Verbesserung der neurologischen Defizite als auch eine verringerte Sterblichkeit in der rHA-Infestin-4-Gruppe.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Effekte durch rHA-Infestin-4 in den verglichenen Spezies könnte sein, dass die gewählte Dosierung von rHA-Infestin-4 in der Maus (200 mg/kg) FXIIa nicht vollständig inhibieren konnte. Die Ratten erhielten in der vorgestellten Studie jedoch nur 100 mg/kg rHA-Infestin-4, und es konnte ein protektiver Effekt nachgewiesen werden. Außerdem bestehen Unterschiede im tMCAO-Modell, denn bei den Ratten wurde die Ischämie für 90 min aufrechterhalten, bei den Mäusen hingegen für 60 min. Darüber hinaus ist auch denkbar, dass sich die Ischämie-induzierten Prozesse oder einzelne Reaktionen der Reperfusionsschäden in Mäusen und Ratten unterscheiden.

Mögliche Indikationen von FXIIa-Inhibitoren wären einerseits die Gabe vor einer Rekanalisationstherapie mittels rt-PA. Andererseits könnte ein FXIIa-INH Warfarin zur Schlaganfallprophylaxe ersetzen, beispielsweise bei Risikofaktoren wie Vorhofflimmern. Eine schwedische Studie ergab, dass nur etwa 46 % der Patienten mit bekanntem Vorhofflimmern prophylaktisch einen Vitamin-K-Antagonisten erhielten [Björck S et al. 2013]. Die Ursache hierfür ließen die Autoren offen, jedoch kann angenommen werden, dass das Risiko für ungewollte Blutungen in den meisten Fällen zu groß war. Es lässt sich daher spekulieren, dass zurzeit bei einem ersten akuten Schlaganfall viele Patienten von einem therapeutischen Behandlungsansatz profitieren könnten. Andererseits könnte eine prophylaktische Behandlungsstrategie mit einem FXIIa-INH Vorteile als Präventionsmaßnahme nach einem ersten akuten Schlaganfall darstellen, da dieser als Risikofaktor für einen erneuten Schlaganfall gilt. Laut Hankey erhöht ein voran gegangener Schlaganfall das Risiko für einen erneuten Schlaganfall auf 4 % im ersten Monat bzw. auf 12 % im ersten Jahr nach dem initialen Schlaganfall [Hankey GJ 2003].

Die Resultate der vorliegenden Arbeit und die Daten aus der Studie mit Ratten weisen außerdem darauf hin, dass eine prophylaktische FXIIa-Inhibition im murinen tMCAO-Modell das Risiko der Schlaganfall-assoziierten Mortalität innerhalb der ersten 24 h reduziert. Außerdem geht die Behandlung mit einem geringeren Blutungsrisiko einher, als bei einer Behandlung mit den gängigen oralen Antikoagulanzen wie Vitamin-K-Antagonisten.

Im rein prophylaktischen Behandlungsansatz des murinen tMCAO-Modells zeigte sich jedoch auch bei einer rHA-Infestin-4-Behandlung eine stärkere neuroprotektive Wirksamkeit, als im direkten Vergleich für anti-FXIIa MAb 3F7 beobachtet wurde. Möglicherweise sind dafür grundlegende Unterschiede auf Molekülebene verantwortlich. Denn auch die Größe der therapeutisch eingesetzten Moleküle könnte für ihre Effektivität eine Rolle spielen. Bei rHA-Infestin-4 ist die FXIIa-inhibitorische Domäne an Humanalbumin gekoppelt. Das gesamte Fusionsprotein besitzt ein Molekulargewicht von etwa 66 kDa, wobei das Molekulargewicht von Infestin-4 selbst lediglich ca. 7 kDa beträgt [Hagedorn I et al. 2010]. Verglichen damit ist der anti-FXIIa MAb 3F7 wesentlich größer, denn als Antikörper der IgG-Klasse besitzt er ein durchschnittliches Molekulargewicht von 150 kDa [Larsson M et al. 2014].

Durch seine geringe Größe kann rHA-Infestin-4 daher vermutlich auch kleinere Perforationen der BHS nach einer Ischämie überwinden, die ein großes Molekül wie ein IgG nicht passieren kann. Eine BHS-Dysfunktion ermöglicht die Extravasation von Plasma und Proteinen in das geschädigte Hirngewebe. Es gibt in der aktuellen Literatur keine Angaben über die maximale Größe der diffundierenden Komponenten. Jedoch ist wahrscheinlich, dass die Lücken in der BHS abhängig sind vom Grad der Ischämie-induzierten Schädigung. Damit wäre die pharmakologische Wirkung von relativ großen therapeutischen Proteinen, wie beispielsweise der anti-FXIIa MAb 3F7, begrenzt auf das ischämischen Kerngebiet und eine intravasale Wirkung. Die kleineren rHA-Infestin-4 Moleküle jedoch könnten auch in den Gebieten der moderaten ZNS-Schädigung die BHS passieren und lokal thrombo-inflammatorische Prozesse einschränken. Demzufolge könnte die geringere Größe von rHA-Infestin-4 auch zur höheren Effizienz in der prophylaktischen Schlaganfall-Behandlung beigetragen haben.

Ein weiterer Unterschied der FXIIa-Inhibitoren besteht in ihrer Selektivität, da der anti-FXIIa MAb 3F7 spezifisch und selektiv den humanen FXIIa inhibiert und eine Kreuzreaktivität gegen den murinen FXIIa hat. Dahingegen konnte für rHA-Infestin-4 gezeigt werden, dass es 90 % des murinen, plasmatischen FXIIa hemmt. Außerdem wurde *in vitro* bei einem 100-fachen molaren Überschuss von rHA-Infestin-4 eine Inhibition von aktiviertem FXa nachgewiesen, was jedoch vermutlich in einer therapeutischen Dosierung kaum relevant sein dürfte [Hagedorn I et al. 2010]. Darüber hinaus könnte rHA-Infestin-4 mit größerer Affinität an den murinen FXIIa binden, als der monoklonale Antikörper, der ja gegen die humane Form des FXIIa entwickelt wurde.

Ein weiterer im murinen tMCAO-Modell untersuchter FXII(a)-Inhibitor mit eindeutiger, neuroprotektiver Wirksamkeit ist PCK, der parallel zu den FXII-K.O.-Mäusen getestet wurde [Kleinschnitz C et al. 2006]. PCK ist jedoch ein unspezifischer Inhibitor, der außer FXIIa auch andere Proteasen des KPS in-

hibiert. Daher ist es möglich, dass die Neuroprotektion unter prophylaktischer PCK-Applikation durch die gleichzeitige Inhibition von Kallikrein, FXIIa, und FXIa verursacht werden [Tans G et al. 1987].

Dass außer FXIIa auch die Kallikrein-vermittelte BK-Freisetzung im tMCAO-Modell zu der weiteren Ausbreitung der initialen Infarktschäden beiträgt, wird durch die Beobachtungen von Austinat et al. unterstützt. Hierbei wurde die Rolle des Bradykinin-Rezeptors B1-R im experimentellen Schlaganfallmodell untersucht, dessen Expression während inflammatorischer Reaktionen induziert wird. Durch die Blockade des B1-R konnte eine Verbesserung in neurologischen Defiziten, Infarktvolumen und auch in der Ödembildung demonstriert werden, wohingegen für die Blockade des ubiquitären B2-R keine schützende Wirksamkeit im murinen tMCAO-Modell beobachtet wurde [Austinat M et al. 2009].

Weiterhin spricht die Publikation von Langhauser et al. dafür, dass die FXIIa-induzierte Bradykininfreisetzung in der Schlaganfallpathologie ebenfalls eine übergeordnete Rolle spielt. Hier wurden Kininogen-defiziente Mäuse im tMCAO-Fadenmodell untersucht [Langhauser F et al. 2012]. Kininogen wird dem Kontaktphasensystem zugeordnet und seine Aktivierung führt zur Freisetzung des hochwirksamen Peptids BK [Maas C et al. 2011]. Dass eine Kininogen-Defizienz in diesem Modell die klinischen Symptome und das Infarktvolumen verglichen mit den Positivkontrollen signifikant verbessern konnten, weist auf die Bedeutung der BK-Freisetzung im murinen tMCAO-Modell hin. Darüber hinaus konnten Langhauser et al. 24 h nach der Ischämie/Reperfusion eine reduzierte Ödementwicklung und eine Verringerung der inflammatorischen Reaktionen beobachten [Langhauser F et al. 2012]. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Daten der vorliegenden Arbeit, wobei der selektive anti-FXIIa MAb 3F7 zu einer reduzierten Inflammation führte (Kap. 4.3.1).

Möglicherweise kann ein spezifischer FXIIa-INH in der Pathophysiologie des murinen tMCAO-Modells nicht nur die Mikrothrombose-assoziierten Reperfusionsschäden verringern, sondern außerdem die BK-Freisetzung limitieren. Damit könnte letztendlich die inflammatorische Reaktion nach einer erfolgreichen Reperfusion und eine potentielle Ödementstehung begrenzt werden. Erste Hinweise auf diesen potenziellen zusätzlichen Wirkmechanismus ergaben sich aus den unterschiedlichen Beobachtungen, nach denen in den FXII-K.O.-Mäusen sehr viel deutlichere neuroprotektive Effekte gefunden wurden, als beispielsweise in der pharmakologischen, selektiven FXIIa-Inhibition [Hagedorn I et al. 2010; Kleinschnitz C et al. 2006; Kraft P et al. 2010; Krupka J et al. 2013].

Alle in diesem Unterkapitel beschriebenen murinen Studien wurden im Labor von Prof. Dr. Christoph Kleinschnitz durchgeführt. Daher sind technisch bedingte Unterschiede generell für die Durchführung

des tMCAO-Fadenmodells vernachlässigbar. Zudem ist das verwendete Schlaganfallmodell weit verbreitet und wissenschaftlich anerkannt, da es eine hohe Reproduzierbarkeit mit einer relativ einfachen Durchführung vereint. Die transiente Okklusion über 60 min simuliert einen Schlaganfall mit spontaner oder pharmakologischer Rekanalisation, die sowohl im Patienten als auch im Nagermodell eine sekundäre Schädigung zur Folge hat [Coutts SB et al. 2009; Stoll G et al. 2008].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass eine Diskrepanz zwischen einem prophylaktischen und therapeutischen Behandlungsansatz der FXIIa-Inhibition besteht. Dies verdeutlicht den großen Einfluss auf die zeitnahe Verfügbarkeit eines Therapeutikums im Einklang mit dem Motto „*time is brain*“. Eine Reduzierung der Reperfusionsschäden durch eine FXIIa-Hemmung scheint jedoch bei einer prophylaktischen Substanz-Applikation den größten neuroprotektiven Effekt auszuüben. Eine mögliche Anwendung der FXIIa-INHs in der klinischen Praxis könnte daher einerseits in der Prävention bei Individuen mit erhöhtem Risiko für einen ischämischen Schlaganfall liegen und andererseits als Prophylaxe gegen einen erneuten Schlaganfall eingesetzt werden. Ein weiterer Vorteil der prophylaktischen FXIIa-INH-Behandlung besteht in der physiologisch ablaufenden Hämostase unter FXIIa-Hemmung, die als Komplikation bei den gängigen oralen Antikoagulanzen auftreten können.

5.5 Ausblick

Das neuartige Konzept zur pharmakologischen Antithrombose mittels FXIIa-Inhibitoren bietet viele Vorteile. Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass eine FXIIa-Inhibition besonders unter arteriellen Flussbedingungen und einer Fremdoberflächen-induzierten Thrombose protektiv wirkt. Der Effekt des FXIIa-INH in einem Stase-induzierten Thrombosemodell erbrachte hier keinen offensichtlichen Vorteil. Des Weiteren wurden Hinweise für eine schützende Wirksamkeit der FXIIa-INH in einem prophylaktischen Behandlungsansatz im murinen ischämischen Schlaganfallmodell gefunden. Der beobachtete antithrombotische Effekt zog keine erhöhte Blutungsneigung in den untersuchten Modellen nach sich.

Da jedoch die physiologische Rolle von FXIIa noch nicht gänzlich bekannt ist, sind auch potenzielle Nebenwirkungen einer FXIIa-Inhibition zurzeit noch nicht vollständig kalkulierbar. Die Untersuchung der FXII-K.O.-Mäuse war ein wichtiger erster Schritt zur Erforschung der Rolle von FXIIa *in vivo* [Pauer HU et al. 2004; Renné T et al. 2005; Kleinschnitz C et al. 2006; Renné T et al. 2006]. Da sich diese Mäuse nur in einer verlängerten aPTT und einer gestörten Thrombusbildung von den Wildtypen un-

terscheiden, scheint FXIIa für die normale Gerinnungsfunktion in einer gesunden Maus keine Rolle zu spielen.

Führt eine FXIIa-Inhibition zu einer Thrombophilie?

Inwiefern diese Beobachtung auf den Menschen übertragbar ist, wird derzeit debattiert. Einerseits gibt es Hinweise darauf, dass FXII keine Rolle für eine Thrombophilie spielt, andererseits wird eine FXII-Defizienz mit einem erhöhten Risiko mit dem Auftreten thrombotischer Ereignisse in Verbindung gebracht [Doggen CJ et al. 2006; Girolami A et al. 2004; Grundt H et al. 2004; Halbmayer WM et al. 1992; Koster T et al. 1994; Miller GJ et al. 1997; Zeerleder S et al. 1999]. Die Kontroverse wird besonders deutlich bei der Beobachtung, dass eine U-förmige steigende Assoziation zwischen FXII-Plasmaspiegel und einem generellen Mortalitätsrisiko besteht, wobei paradoxerweise eine schwere FXII-Defizienz wiederum keinen negativen Effekt auf die generelle Mortalität hat [Endler G et al. 2007].

Eine wahrscheinliche Ursache dieser Ambivalenz ist, dass die physiologischen Funktionen der Protease noch nicht hinreichend bekannt sind. Es ist jedoch bekannt, dass FXII(a) *in vivo* mehr als eine Funktion ausübt, die über die intrinsische Gerinnung hinaus gehen. Daher ist ein Mangel bzw. Überschuss der Protease nicht eindeutig als generell protektiv oder pathologisch einstuftbar.

Mit Fokus auf die prothrombotische Wirkung von FXIIa ist eventuell möglich, dass eine systemische FXIIa-Inhibition durch Störung der dreidimensionalen Thrombusbildung zu einem erhöhten Thrombose-Risiko führen könnte [Gailani D et al. 2007]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine potenzielle Thrombophilie nicht untersucht, was ein weiterführender Ansatz für zukünftige Projekte sein sollte. Die FXIIa-Inhibition wurde in den Versuchstieren dieser Arbeit so gewählt, dass der plasmatische FXIIa rechnerisch zu 100 % gehemmt wurde. Dementsprechend simuliert dies eine schwere FXII-Defizienz, wobei jedoch das Zymogen weiterhin im Plasma verbleibt. In der Zukunft sollte außerdem evaluiert werden, ob die FXIIa-Inhibition erst ab einer definierten Dosierung einen antithrombotischen Schutz bietet. Denn im Falle einer Fehldosierung des FXIIa-INH als Arzneimittel muss das damit verbundene Risiko bekannt sein.

Des Weiteren sollte zusätzlich untersucht werden, in welchem Ausmaß die FXII(a)-vermittelte Inflammation beeinflusst wird. Dies könnte zum Beispiel anhand eines Ansatzes mit Endothelzellen in Kultur, im Tiermodell anhand immunhistologischer Färbungen und mittels Proteinanalyse der relevanten Faktoren überprüft werden. Außerdem sollten in diesem Zusammenhang auch die Folgen einer langfristigen Antithrombose mittels FXIIa-Inhibitoren evaluiert werden.

Potenzielle Ergänzungen zu den verwendeten Thrombosemodellen

Für die Simulation einer arteriellen Thrombose wurden in der vorliegenden Arbeit die mechanische Aortenkompression in der Maus und eine FeCl_3 -induzierte Thrombose beider *Aa. femorales* im Kaninchen herangezogen. Die verwendeten Modelle sind gut reproduzierbar und relativ einfach durchzuführen, entsprechen aber nur teilweise den pathophysiologischen Reaktionen einer arteriellen Thrombose. Da beim Aortenkompressionsmodell noch nicht vollständig bekannt ist, welche Faktoren konkret die okklusive Thrombose herbeiführen, wäre eine mögliche Ergänzung die histologische Untersuchung des okkludierten Gefäßabschnitts und des Thrombus. Dafür könnte möglicherweise ein gegen den humanen anti-FXIIa MAb 3F7 gerichteter Antikörper die Bindungsstellen des FXIIa-INH immunhistologisch *in situ* aufzeigen. Außerdem könnte mittels einer Doppelfluoreszenzfärbung untersucht werden, ob die Thrombose eher durch die Freilegung der subendothelialen Matrix oder TF-abhängig eingeleitet wird.

Obwohl die FeCl_3 -induzierte Thrombose als anerkanntes Modell angewandt wird, ist die eingeleitete Thrombose artifiziell, denn es existiert kein direktes physiologisches Pendant zu diesem Modell. Daher wäre es von Vorteil, die FXIIa-Inhibitoren in einem weiteren adäquaten Modell der Arteriosklerose zu untersuchen, wie beispielsweise in Apolipoprotein E-defizienten Mäusen. Durch das Fehlen des Apolipoproteins E sammeln sich vermehrt Triglyceride und Cholesterin im Plasma, was die Bildung einer arteriosklerotischen Läsion forciert [Hayek T et al. 1994]. Dadurch könnten Erkenntnisse gewonnen werden, die die Rolle von FXIIa neben der Gefäßverletzungs-induzierten Thrombose auch bei einer „sterilen“ intravasalen Inflammation beleuchten.

Ähnlich dazu sollte auch die FXIIa-Inhibition bei der venösen Thrombose tiefer untersucht werden. Neben dem murinen FeCl_3 -induzierten Thrombosemodell wurde für die vorliegende Arbeit ein Stase-induziertes Thrombosemodell im Kaninchen untersucht. Unter pathophysiologischen Umständen entsteht die venöse Thrombose in den tiefen Beinvenen zunächst auch durch eine Flussreduktion. Daher wäre es vorteilhaft, die FXIIa-Inhibition außerdem in einem Ligatur-Modell zu untersuchen, das über eine Stenose die Thrombose einleitet. Möglicherweise kann für einen FXIIa-INH unter residualen Flussbedingungen eine erhöhte Wirksamkeit beobachtet werden, die im Zusammenhang mit einer reduzierten NETose-induzierten Thrombose steht [Fuchs TA et al. 2012].

Da FXIIa die Thrombose an Fremdoberflächen herbeiführt, wurde für die vorliegende Arbeit ein A/V Shuntmodell in der Maus und im Kaninchen durchgeführt. In zukünftigen Versuchen könnte zusätzlich zur Okklusionsrate des A/V Shunts außerdem die Entwicklung und Zusammensetzung des thrombotischen Materials aus den Glaselementen weiter analysiert werden. Dadurch ließe sich darauf

zurückschließen, ob wie bei Renné T et al. die initiale Plättchenadhäsion unbeeinträchtigt ablief und ein FXIIa-INH das sekundäre Thrombuswachstum unterstützt [Renné T et al. 2006]. Darüber hinaus wäre die Durchführung der Versuche aus der vorliegenden Arbeit und des ECMO-Modells von Larsson et al. in anderen Spezies vorteilhaft. Auf diese Weise könnten Erkenntnisse über die Wirksamkeit der FXIIa-Inhibition auch in dem humanen System näher verwandten Spezies getestet werden.

Außerdem wäre für das A/V Shuntmodell auch möglich, den thrombotischen Reiz im Element selbst zu variieren, beispielsweise durch eine Kollagen-Beschichtung. Damit könnte evaluiert werden, unter welchen äußeren Bedingungen ein FXIIa-INH am potentesten antithrombotisch wirkt.

Potenzielle Ergänzungen der Studien im murinen Schlaganfallmodell

Für die vorliegende Arbeit wurde die Dauer der Reperfusion auf 24 h festgelegt. Bisher sind in der Literatur keine Studien bekannt, in denen eine FXIIa-Inhibition nach einer längeren Reperusionsphase untersucht wurde. Daher sollte dies zusätzlich im murinen tMCAO-Modell mit einem prophylaktischen und einem therapeutischen Behandlungsansatz über eine Zeitspanne von mindestens 7 Tagen nach Reperfusion getestet werden. Denn die 24-stündige Reperfusion gibt zwar Auskunft über eine unmittelbare protektive Wirksamkeit der Testsubstanz in der akuten Phase eines ischämischen Schlaganfalles, ist aber nicht der erstrebte Endpunkt bei der Behandlung menschlicher Patienten. Bei einer verlängerten Reperusionsphase könnte außerdem mittels MRI-Technik zum Einen die individuelle Entwicklung des infarzierten Gewebes über die Zeit beobachtet werden. Zum Anderen müssten auch im Sinne des Tierschutzes weniger Tiere eingesetzt werden, da die individuelle Infarktentwicklung in jedem einzelnen Tier über mehrere Tage oder Wochen verfolgt werden kann. Andernfalls müssen mehrere Tiere pro Zeitpunkt geopfert werden, um anhand der TTC-Färbung das Infarktvolumen zu bestimmen.

Darüber hinaus wurden für die hier vorgestellten Studien nur junge, gesunde und männliche Mäuse verwendet. Dies entspricht nicht der klinischen Situation, da Alter und Geschlecht in Patientengruppen häufig sehr durchmischt sind. Daher sollten weitere Studien mit weiblichen und älteren Mäusen durchgeführt werden. Des Weiteren haben Patienten meist mehr als eine Erkrankung, im Gegensatz zu den jungen Mäusen. Um den Faktor der Komorbiditäten Rechnung zu tragen, sollten auch weitere Erkrankungen wie beispielsweise ein Modell für Diabetes im Rahmen der FXIIa-Inhibition untersucht werden. Dafür ließe sich das Modell der mittels Streptozotocin hervorgerufenen Diabetes in Mäusen an als Grundlage hinzuziehen.

Um auszuschließen, dass die FXIIa-Inhibition nur im Fadenmodell des Schlaganfalles wirksam ist, könnte außerdem die Einleitung der Ischämie variiert werden. Beispielsweise wurde kürzlich ein Ratten-Modell entwickelt, bei dem ein autologes Blutgerinnsel die Ischämie herbeiführt. Des Weiteren könnte außerdem der Zeitpunkt und die Häufigkeit der Substanzapplikation untersucht werden. Und schließlich könnte das Modell auch in dem Menschen näher verwandten Spezies durchgeführt werden.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde keine Messung eines Ischämie/Reperfusionen-assoziierten Ödems durchgeführt. Da spekuliert werden kann, dass ein FXIIa-INH auch einer BK-vermittelte Ödem-entwicklung entgegenwirkt, sollte dies noch ergänzt werden. Als Vorgehensweise bieten sich die Methoden der Nass-Trocken Gewichtsbestimmung der zerebralen Hemisphären und der Evans Blue-Extravasationsmessung an, wenn nicht auf die MRI-Technik zurückgegriffen werden kann. Des Weiteren könnten immunhistochemische Färbungen durchgeführt werden, um *in situ* die Ausprägung einer Reperfusionen-assoziierten Mikrothrombose und den Verlauf der Immunzell-Infiltration in das ischämische Gewebe zu evaluieren.

Optimierungspotenzial der FXIIa-Inhibitoren

Die selektive FXIIa-Inhibition ist ein attraktiver Ansatz zum Schutz vor einer Thrombose ohne eine Hämophilie zu induzieren. Der anti-FXIIa MAb 3F7 bietet die Vorteile eines humanen IgG, der spezifisch an FXIIa bindet und vermutlich auch bei einer langfristigen Applikation keine Unverträglichkeit hervorruft. Durch seine molekulare Größe von etwa 150 kDa kann er jedoch die Blutbahn eventuell auch bei einer BHS-Perforation nicht verlassen. Besonders im Falle der Ischämie-induzierten BHS-Dysfunktion könnte dieser Größenunterschied zwischen rHA-Infestin-4 (66 kDa) und dem anti-FXIIa MAb 3F7 zu dem unterschiedlichen Wirkungsgrad der prophylaktischen Substanzapplikation geführt haben [Hagedorn I et al. 2010; Larsson M et al. 2014].

Um die Mobilität des therapeutischen Antikörpers in den extravasalen Raum zu fördern, würde eine Größenreduzierung eventuell einen Vorteil verschaffen. Dazu könnten entweder lediglich die Fab-Fragmente des therapeutischen Antikörpers zur FXIIa-Inhibition verabreicht werden, oder die noch kleineren Nanobodies. Nanobodies bestehen aus der variablen Domäne eines Schwerekettenantikörpers, welche die Affinität zum Substrat vermittelt. Ein gegen FXIIa gerichteter Nanobody sollte dieselben Eigenschaften wie der IgG-Antikörper aufweisen, mit dem Vorteil der geringeren Größe. Von der Gruppe um de Maat wurden bereits Nanobodies unterschiedlicher Affinität gegen FXIIa vorgestellt. Mit Hilfe dieses Nanobodies konnten de Maat et al. *in vitro* FXII-Spaltprodukte mit unterschied-

licher Aktivität in Humanplasma auffinden [de Maat S et al. 2013]. Es besteht auch die Möglichkeit, diese einkettigen Antikörper für therapeutische Zwecke einzusetzen [Roovers RC et al. 2007]. Dies wäre ein Ansatz für zukünftige Studien zur FXIIa-Inhibition, nicht nur im murinen tMCAO-Modell, sondern auch für die Indikation der optimierten Antithrombose.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Unter physiologischen Bedingungen limitiert die Hämostase nach einer Gefäßverletzung den Blutverlust. Dagegen fördern eine Plättchen-Aktivierung und die Blutgerinnung unter pathologischen Bedingungen die Entstehung einer Thrombose. Hierbei bewirkt der Kontakt zwischen Blut und Fremdoberflächen die Einleitung des intrinsischen Gerinnungsweges über eine FXII-Aktivierung. Dies ist beispielsweise eine Komplikation bei der Anwendung einer extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO). Folglich benötigen Patienten eine stabile antikoagulative Medikation, die jedoch mit einem erhöhten Blutungsrisiko einhergeht. Aus aktuellen Studien in verschiedenen Thrombosemodellen in Nagern und Primaten ging hervor, dass eine Defizienz oder Hemmung von FXII(a) eine verlässliche antithrombotische Wirksamkeit bietet. Beachtenswert war dabei die uneingeschränkte hämostatische Kapazität in den behandelten Tieren. Daher war die erste Fragestellung der vorliegenden Arbeit die antithrombotische Wirksamkeit von zwei spezifischen FXIIa-Inhibitoren zu untersuchen. Diese waren ein voll humaner, gegen FXIIa gerichteter monoklonaler Antikörper (anti-FXIIa MAb 3F7) und das rekombinante Protein rHA-Infestin-4, welches aus einer Raubwanze stammt. Beide Substanzen zeigten in verschiedenen Thrombosemodellen einen stabilen antithrombotischen Effekt, z. B. bei dem Fremdoberflächen-induzierten Thrombosemodells des arteriovenösen Shunt-Modells in den Spezies Maus und Kaninchen.

Der zweite Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, inwiefern eine FXIIa-Hemmung im murinen Schlaganfallmodell zu einer Neuroprotektion beiträgt. Aus aktuellen Studien im Schlaganfallmodell ist bekannt, dass FXII-defiziente Mäuse und prophylaktisch mit rHA-Infestin-4 behandelte reduzierte klinische Defizite und ein reduzierte Infarkt volumen aufwiesen. Dies ist vermutlich auf verringerte Reperfusionsschäden zurück zu führen. Daher wurde für die vorliegende Arbeit die prophylaktische Applikation von anti-FXIIa MAb 3F7 im gleichen Modell untersucht. In einer zusätzlichen Studie wurde rHA-Infestin-4 therapeutisch verabreicht. Der beste neuroprotektive Effekt zeigte sich in der prophylaktischen Substanz-Applikation, denn hier wurde eine Reduzierung von Inflammation, Mikrothrombose und Mortalität beobachtet, ohne eine erhöhte Blutungsneigung hervorzurufen.

Die Resultate dieser Arbeit deuten also darauf hin, dass eine FXIIa-Inhibition bei Thrombosen unterschiedlicher Entstehungsarten einen verlässlichen antithrombotischen Schutz bietet, ohne die physiologische Hämostase zu beeinträchtigen. Weiterhin konnte die prophylaktische Behandlung mit FXIIa-Inhibitoren die klinischen Defizite im murinen Schlaganfallmodell signifikant verbessern.

6.1 Summary

While hemostasis involving platelet activation and blood coagulation is crucial to limit posttraumatic blood loss, under pathological conditions it can also contribute to thrombosis. Furthermore, in clinical scenarios where blood becomes exposed to anionic foreign surfaces like in extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) the intrinsic pathway of coagulation is initiated via activation of factor XII (FXII). Consequently, these patients require a robust anticoagulative therapy, which is, however, associated with an increased bleeding risk. Recent studies in rodents and primates have demonstrated that deficiency or inhibition of FXIIa provided a reliable antithrombotic effect in several thrombosis models. Most notably, physiological hemostasis was not affected in these animals. Therefore, the first aim of the present thesis was to evaluate the antithrombotic efficacy of two specific FXIIa-inhibitors, i.e. rHA-Infestin-4, a recombinant protein derived from the hematophagous insect *Triatoma infestans*, and a fully human monoclonal antibody directed against FXIIa (anti-FXIIa MAb 3F7). Both FXIIa-inhibitors were tested in different thrombosis models and revealed a profound antithrombotic efficacy (e. g. when thrombus formation was triggered by foreign surfaces in the arteriovenous shunt model in mice and rabbits).

The second aim of this thesis was to investigate the neuroprotective effect of FXIIa-inhibition in a murine ischemic stroke model with reperfusion injury (R/I). Recent stroke studies showed an improved outcome in neurofunctional behavior and a reduced infarct volume in FXII-deficient mice, probably due to a reduced R/I. An additional study confirmed the neuroprotective efficacy of prophylactic FXIIa-inhibition by applying rHA-Infestin-4. Therefore, the efficacy of a prophylactic treatment with anti-FXIIa MAb 3F7 was studied in this model of murine ischemic stroke in the present thesis. Moreover, rHA-Infestin-4 was applied in a therapeutic approach. The best neuroprotection was observed in the prophylactic approach, since the therapeutic rHA-Infestin-4 application could not improve the disease outcome. In line with these results, the prophylactic FXIIa-inhibition ameliorated the R/I-associated inflammatory reactions, microthrombosis and dramatically reduced mortality at 24 hours after reperfusion. Notably, the risk for intracranial hemorrhage was not increased.

Taken together, this thesis supports the assumption that targeting FXIIa may exert a potent antithrombotic approach in clinical scenarios involving contact activation at foreign surfaces like ECMO without interfering with physiological hemostasis. Additionally, inhibiting FXIIa prophylactically significantly improved the disease outcome after ischemic stroke in mice.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams,RJ; Albers,G; Alberts,MJ; Benavente,O; Furie,K; Goldstein,LB; Gorelick,P; Halperin,J; Harbaugh,R; Johnston,SC; Katzan,I; Kelly-Hayes,M; Kenton,EJ; Marks,M; Sacco,RL, and Schwamm,LH. Update to the AHA/ASA recommendations for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack. *Stroke* 2008; 39 (5) 1647-1652.
- Ahmad,SS; London,FS, and Walsh,PN. The assembly of the factor X-activating complex on activated human platelets. *J Thromb Haemost.* 2003; 1 (1) 48-59.
- Aleman, MM; Walton, BL; Byrnes, JR; Wolberg, AS. Fibrin(-ogen) and red blood cells in venous thrombosis. *Thromb Res.* 2014; 133 Suppl 1:S38-40
- Amara,U; Flierl,MA; Rittirsch,D; Klos,A; Chen,H; Acker,B; Bruckner,UB; Nilsson,B; Gebhard,F; Lambris,JD, and Huber-Lang,M. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *J Immunol* 2010; 185 (9) 5628-5636.
- Amarenco,P; Lavalley,PC; Labreuche,J; Ducrocq,G; Juliard,JM; Feldman,L; Cabrejo,L; Meseguer,E; Guidoux,C; Adrai,V; Ratani,S; Kusmierk,J; Lapergue,B; Klein,IF; Gongora-Rivera,F; Jaramillo,A; Mazighi,M; Touboul,PJ, and Steg,PG. Prevalence of coronary atherosclerosis in patients with cerebral infarction. *Stroke* 2011; 42 (1) 22-29.
- Astrup,J; Siesjo,BK, and Symon,L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 1981; 12 (6) 723-725.
- Austinat,M; Braeuninger,S; Pesquero,JB; Brede,M; Bader,M; Stoll,G; Renné,T, and Kleinschnitz,C. Blockade of bradykinin receptor B1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral infarction and brain edema. *Stroke* 2009; 40 (1) 285-293.
- Ayata,C and Ropper,AH. Ischaemic brain oedema. *J Clin Neurosci* 2002; 9 (2) 113-124.
- Back,J; Lang,MH; Elgue,G; Kalbitz,M; Sanchez,J; Ekdahl,KN, and Nilsson,B. Distinctive regulation of contact activation by antithrombin and C1-inhibitor on activated platelets and material surfaces. *Biomaterials* 2009; 30 (34) 6573-6580.
- Back,T. Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept. *Cell Mol Neurobiol.* 1998; 18 (6) 621-638.
- Badimon,JJ; Zaman,A; Helft,G; Fayad,Z, and Fuster,V. Acute coronary syndromes: pathophysiology and preventive priorities. *Thromb Haemost.* 1999; 82 (2) 997-1004.
- Barone,FC; Arvin,B; White,RF; Miller,A; Webb,CL; Willette,RN; Lysko,PG, and Feuerstein,GZ. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997; 28 (6) 1233-1244.
- Barone,FC; Globus,MY; Price,WJ; White,RF; Storer,BL; Feuerstein,GZ; Busto,R, and Ohlstein,EH. Endothelin levels increase in rat focal and global ischemia. *J Cereb. Blood Flow Metab* 1994; 14 (2) 337-342.
- Barr,JD; Chauhan,AK; Schaeffer,GV; Hansen,JK, and Motto,DG. Red blood cells mediate the onset of thrombosis in the ferric chloride murine model. *Blood* 2013; 121 (18) 3733-3741.
- Baufreton,C. Role of surgical factors in strokes after cardiac surgery. *Arch Cardiovasc Dis* 2010; 103 (5) 326-332.
- Bederson,JB; Pitts,LH; Tsuji,M; Nishimura,MC; Davis,RL, and Bartkowski,H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986; 17 (3) 472-476.
- Bendszus,M and Stoll,G. Silent cerebral ischaemia: hidden fingerprints of invasive medical procedures. *Lancet Neurol* 2006; 5 (4) 364-372.
- Berkefeld,J; du Mesnil de,RR; Sitzer,M, and Zanella,FE. [Mechanical recanalization in acute stroke treatment]. *Radiologe* 2005; 45 (5) 455-460.
- Bian,LG; Zhang,TX; Zhao,WG; Shen,JK, and Yang,GY. Increased endothelin-1 in the rabbit model of middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Lett.* 1994; 174 (1) 47-50.
- Björck, S; Palaszewski, B; Friberg, L; Bergfeldt L. Atrial fibrillation, stroke risk, and warfarin therapy revisited: a population-based study. *Stroke.* 2013; 44 (11) 3103-8.
- Bock,PE; Shore,JD; Tans,G, and Griffin,JH. Protein-protein interactions in contact activation of blood coagulation. Binding of high molecular weight kininogen and the 5-(iodoacetamido) fluorescein-labeled kininogen light chain to prekallikrein, kallikrein, and the separated kallikrein heavy and light chains. *J Biol Chem* 1985; 260 (23) 12434-12443.
- Boldt,J; Zickmann,B; Herold,C; Scholz,S; Dapper,F, and Hempelmann,G. Heparin management during cardiac surgery with respect to various blood-conservation techniques. *Surgery* 1992; 111 (3) 260-265.
- Bork,K and Davis-Lorton,M. Overview of hereditary angioedema caused by C1-inhibitor deficiency: assessment and clinical management. *Eur Ann Allergy Clin Immunol* 2013; 45 (1) 7-16.
- Botchkina,GI; Meistrell,ME, III; Botchkina,IL, and Tracey,KJ. Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol Med* 1997; 3 (11) 765-781.
- Bouma,BN and Griffin,JH. Human blood coagulation factor XI. Purification, properties, and mechanism of activation by activated factor XII. *J Biol Chem* 1977; 252 (18) 6432-6437.

- Boyle, EM Jr; Pohlman, TH; Cornejo, CJ; Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: ischemia-reperfusion. *Ann Thorac Surg*. 1996 Dec;62(6):1868-75
- Braat,EA; Dooijewaard,G, and Rijken,DC. Fibrinolytic properties of activated FXII. *Eur J Biochem* 1999; 263 (3) 904-911.
- Braeuninger,S; Kleinschnitz,C; Nieswandt,B, and Stoll,G. Focal cerebral ischemia. *Methods Mol Biol* 2012; 788 29-42.
- Breder,CD; Tsujimoto,M; Terano,Y; Scott,DW, and Saper,CB. Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system. *J Comp Neurol* 1993; 337 (4) 543-567.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303 (5663) 1532-5.
- Brück, S; Skrabal, C; Träger, K; Reinelt, H. Risk factors for adverse reactions after protamine administration in adult patients undergoing cardiac surgery- a case report and literature review. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2014; 49(6) 360-6.
- Brooker,RF; Brown,WR; Moody,DM; Hammon,JW, Jr.; Reboussin,DM; Deal,DD; Ghazi-Birry,HS, and Stump,DA. Cardiectomy suction: a major source of brain lipid emboli during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998; 65 (6) 1651-1655.
- Brown,WR; Moody,DM; Challa,VR; Stump,DA, and Hammon,JW. Longer duration of cardiopulmonary bypass is associated with greater numbers of cerebral microemboli. *Stroke* 2000; 31 (3) 707-713.
- Bruce,AJ; Boling,W; Kindy,MS; Peschon,J; Kraemer,PJ; Carpenter,MK; Holtsberg,FW, and Mattson,MP. Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 1996; 2 (7) 788-794.
- Bryant,JW and Shariat-Madar,Z. Human plasma kallikrein-kinin system: physiological and biochemical parameters. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2009; 7 (3) 234-250.
- Buckwalter,MS and Wyss-Coray,T. Modelling neuroinflammatory phenotypes in vivo. *J Neuroinflammation* 2004; 1 (1) 10-
- Bugge,TH; Xiao,Q; Kombrinck,KW; Flick,MJ; Holmback,K; Danton,MJ; Colbert,MC; Witte,DP; Fujikawa,K; Davie,EW, and Degen,JL. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93 (13) 6258-6263.
- Buisson,A; Lesne,S; Docagne,F; Ali,C; Nicole,O; MacKenzie,ET, and Vivien,D. Transforming growth factor-beta and ischemic brain injury. *Cell Mol Neurobiol*. 2003; 23 (4-5) 539-550.
- Buller,HR; Prins,MH; Lensin,AW; Decousus,H; Jacobson,BF; Minar,E; Chlumsky,J; Verhamme,P; Wells,P; Agnelli,G; Cohen,A; Berkowitz,SD; Bounameaux,H; Davidson,BL; Misselwitz,F; Gallus,AS; Raskob,GE; Schellong,S, and Segers,A. Oral rivaroxaban for the treatment of symptomatic pulmonary embolism. *N Engl J Med* 2012; 366 (14) 1287-1297.
- Camejo,G; Hurt-Camejo,E; Wiklund,O, and Bondjers,G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis* 1998; 139 (2) 205-222.
- Camerlingo,M; Salvi,P; Belloni,G; Gamba,T; Cesana,BM, and Mamoli,A. Intravenous heparin started within the first 3 hours after onset of symptoms as a treatment for acute nonlacunar hemispheric cerebral infarctions. *Stroke* 2005; 36 (11) 2415-2420.
- Campos,IT; Amino,R; Sampaio,CA; Auerswald,EA; Friedrich,T; Lemaire,HG; Schenkman,S, and Tanaka,AS. Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor. *Insect Biochem Mol Biol* 2002; 32 (9) 991-997.
- Campos,IT; Tanaka-Azevedo,AM, and Tanaka,AS. Identification and characterization of a novel factor XIIa inhibitor in the hematophagous insect, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *FEBS Lett*. 2004; 577 (3) 512-516.
- Carter,TH; Everson,BA, and Ratnoff,OD. Cabbage seed protease inhibitor: a slow, tight-binding inhibitor of trypsin with activity toward thrombin, activated Stuart factor (factor Xa), activated Hageman factor (factor XIIa), and plasmin. *Blood* 1990; 75 (1) 108-115.
- Castellino,FJ and Ploplis,VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost*. 2005; 93 (4) 647-654.
- Charidimou,A; Kakar,P; Fox,Z, and Werring,DJ. Cerebral microbleeds and recurrent stroke risk: systematic review and meta-analysis of prospective ischemic stroke and transient ischemic attack cohorts. *Stroke* 2013; 44 (4) 995-1001.
- Cheng,Q; Tucker,EI; Pine,MS; Sisler,I; Matafonov,A; Sun,MF; White-Adams,TC; Smith,SA; Hanson,SR; McCarty,OJ; Renné,T; Gruber,A, and Gailani,D. A role for factor XIIa-mediated factor XI activation in thrombus formation in vivo. *Blood* 2010; 116 (19) 3981-3989.
- Chenoweth,DE; Cooper,SW; Hugli,TE; Stewart,RW; Blackstone,EH, and Kirklin,JW. Complement activation during cardiopulmonary bypass: evidence for generation of C3a and C5a anaphylatoxins. *N Engl J Med* 1981; 304 (9) 497-503.
- Choudhri,TF; Hoh,BL; Zerwes,HG; Prestigiacomo,CJ; Kim,SC; Connolly,ES, Jr.; Kottirsch,G, and Pinsky,DJ. Reduced microvascular thrombosis and improved outcome in acute murine stroke by inhibiting GP IIb/IIIa receptor-mediated platelet aggregation. *J Clin Invest* 1998; 102 (7) 1301-1310.

- Citarella,F; Ravon,DM; Pascucci,B; Felici,A; Fantoni,A, and Hack,CE. Structure/function analysis of human factor XII using recombinant deletion mutants. Evidence for an additional region involved in the binding to negatively charged surfaces. *Eur J Biochem* 1996; 238 (1) 240-249.
- Citarella,F; te,VH; Helmer-Citterich,M, and Hack,CE. Identification of a putative binding site for negatively charged surfaces in the fibronectin type II domain of human factor XII--an immunochemical and homology modeling approach. *Thromb Haemost.* 2000; 84 (6) 1057-1065.
- Citarella,F; Tripodi,M; Fantoni,A; Bernardi,F; Romeo,G, and Rocchi,M. Assignment of human coagulation factor XII (fXII) to chromosome 5 by cDNA hybridization to DNA from somatic cell hybrids. *Hum Genet* 1988; 80 (4) 397-398.
- Clausen,BH; Lambertsen,KL; Meldgaard,M, and Finsen,B. A quantitative in situ hybridization and polymerase chain reaction study of microglial-macrophage expression of interleukin-1beta mRNA following permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 2005; 132 (4) 879-892.
- Cochrane,CG and Revak,SD. Dissemination of contact activation in plasma by plasma kallikrein. *J Exp Med* 1980; 152 (3) 608-619.
- Colman,RW. Are hemostasis and thrombosis two sides of the same coin? *J Exp Med* 2006; 203 (3) 493-495.
- Colman,RW and Schmaier,AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood* 1997; 90 (10) 3819-3843.
- Colman,RW; Scott,CF; Schmaier,AH; Wachtfogel,YT; Pixley,RA, and Edmunds,LH, Jr. Initiation of blood coagulation at artificial surfaces. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 516 253-267.
- Cool,DE and MacGillivray,RT. Characterization of the human blood coagulation factor XII gene. Intron/exon gene organization and analysis of the 5'-flanking region. *J Biol Chem* 1987; 262 (28) 13662-13673.
- Coutts,SB and Goyal,M. When recanalization does not improve clinical outcomes. *Stroke* 2009; 40 (8) 2661-
- Couture,R; Harrisson,M; Vianna,RM, and Cloutier,F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2001; 429 (1-3) 161-176.
- Cunningham,KS and Gotlieb,AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest* 2005; 85 (1) 9-23.
- Dalkara,T and Arsava,EM. Can restoring incomplete microcirculatory reperfusion improve stroke outcome after thrombolysis? *J Cereb. Blood Flow Metab* 2012; 32 (12) 2091-2099.
- Dalton,HJ. Extracorporeal life support: moving at the speed of light. *Respir. Care* 2011; 56 (9) 1445-1453.
- Darbousset, R; Thomas, GM; Mezouar, S; Frère, C; Bonier, R; Mackman, N; Renné, T; Dignat-George, F; Dubois, C; Panicot-Dubois, L. Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* 2012; 120 (10) 2133-43.
- Dashwood,MR and Loesch,A. Endothelin-1 as a neuropeptide: neurotransmitter or neurovascular effects? *J Cell Commun. Signal.* 2010; 4 (1) 51-62.
- Davies,CA; Loddick,SA; Toulmond,S; Stroemer,RP; Hunt,J, and Rothwell,NJ. The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb. Blood Flow Metab* 1999; 19 (1) 87-98.
- Davis,AJ and Perkins,MN. Induction of B1 receptors in vivo in a model of persistent inflammatory mechanical hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacology* 1994; 33 (1) 127-133.
- de Agostini,A; Lijnen,HR; Pixley,RA; Colman,RW, and Schapira,M. Inactivation of factor XII active fragment in normal plasma. Predominant role of C-1-inhibitor. *J Clin Invest* 1984; 73 (6) 1542-1549.
- De Meyer,GR; Hoylaerts,MF; Kockx,MM; Yamamoto,H; Herman,AG, and Bult,H. Intimal deposition of functional von Willebrand factor in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol* 1999; 19 (10) 2524-2534.
- De Maat, S; van Dooremalen,S; de Groot, PG and Maas,C. A nanobody-based method for tracking factor XII activation in plasma. *Thromb Haemost.* 2013; 110 (3) 458-468.
- Decrem,Y; Rath,G; Blasioli,V; Cauchie,P; Robert,S; Beaufays,J; Frere,JM; Feron,O; Dogne,JM; Dessy,C; Vanhamme,L, and Godfroid,E. Ir-CPI, a coagulation contact phase inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*, inhibits thrombus formation without impairing hemostasis. *J Exp Med* 2009; 206 (11) 2381-2395.
- del Zoppo,GJ; Izawa,Y, and Hawkins,BT. Hemostasis and alterations of the central nervous system. *Semin Thromb Hemost.* 2013; 39 (8) 856-875.
- del Zoppo,GJ and Mabuchi,T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J Cereb. Blood Flow Metab* 2003; 23 (8) 879-894.
- DeLaria,GA; Tyner,JJ; Hayes,CL, and Armstrong,BW. Heparin-protamine mismatch. A controllable factor in bleeding after open heart surgery. *Arch Surg* 1994; 129 (9) 944-950.
- Demer,LL. A skeleton in the atherosclerosis closet. *Circulation* 1995; 92 (8) 2029-2032.
- Denes,A; Pinteaux,E; Rothwell,NJ, and Allan,SM. Interleukin-1 and stroke: biomarker, harbinger of damage, and therapeutic target. *Cerebrovasc. Dis* 2011; 32 (6) 517-527.
- Derkx,FH; Bouma,BN; Schalekamp,MP, and Schalekamp,MA. An intrinsic factor XII- prekallikrein-dependent pathway activates the human plasma renin-angiotensin system. *Nature* 1979; 280 (5720) 315-316.

- Dinareello,CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011; 117 (14) 3720-3732.
- Discipio,RG. The activation of the alternative pathway C3 convertase by human plasma kallikrein. *Immunology* 1982; 45 (3) 587-595.
- Doggen, CJ; Rosendaal, FR; Meijers, JC. Levels of intrinsic coagulation factors and the risk of myocardial infarction among men: Opposite and synergistic effects of factors XI and XII. *Blood*. 2006; 108 (13) 4045-51.
- Dollery,CM; McEwan,JR, and Henney,AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ. Res* 1995; 77 (5) 863-868.
- Dornia,C; Philipp,A; Bauer,S; Hoffstetter,P; Lehle,K; Schmid,C; Lubnow,M; Stroszczynski,C, and Schreyer,AG. Visualization of thrombotic deposits in extracorporeal membrane oxygenation devices using multidetector computed tomography: a feasibility study. *ASAIO J* 2013; 59 (4) 439-441.
- Doyle,LM; McInerney,JO; Mooney,J; Powell,R; Haikara,A, and Moran,AP. Sequence of the gene encoding the 16S rRNA of the beer spoilage organism *Megasphaera cerevisiae*. *J Ind. Microbiol* 1995; 15 (2) 67-70.
- Dunn,JF; Wu,Y; Zhao,Z; Srinivasan,S, and Natah,SS. Training the brain to survive stroke. *PLoS One* 2012; 7 (9) e45108-
- Dunn,JT; Silverberg,M, and Kaplan,AP. The cleavage and formation of activated human Hageman factor by autodigestion and by kallikrein. *J Biol Chem* 1982; 257 (4) 1779-1784.
- Durukan,A and Tatlisumak,T. Acute ischemic stroke: Overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; 87 (1) 179-97.
- Dutton,RC and Edmunds,LH, Jr. Measurement of emboli in extracorporeal perfusion systems. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1973; 65 (4) 523-530.
- Dziewulska,D and Mossakowski,MJ. Cellular expression of tumor necrosis factor α and its receptors in human ischemic stroke. *Clin Neuropathol*. 2003; 22 (1) 35-40.
- Easton,JD; Saver, JL; Albers,GW; Alberts,MJ; Chaturvedi,S; Feldmann,E; Hatsukami,TS; Higashida,RT; Johnston,SC; Kidwell,CS; Lutsep,HL; Miller,E, and Sacco,RL. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke* 2009; 40 (6) 2276-2293.
- Eckly,A; Hechler,B; Freund,M; Zerr,M; Cazenave,JP; Lanza,F; Mangin,PH, and Gachet,C. Mechanisms underlying FeCl₃-induced arterial thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2011; 9 (4) 779-789.
- Edmunds,LH, Jr. The evolution of cardiopulmonary bypass: lessons to be learned. *Perfusion* 2002; 17 (4) 243-251.
- Endler, G; Marsik, C; Jilma, B; Schickbauer, T; Quehenberger, P; Mannhalter, C. Evidence of a U-shaped association between factor XII activity and overall survival. *J Thromb Haemost*. 2007; 5 (6) 1143-8.
- Engel, O; Kolodziej, S; Dirnagl, U; Prinz V. Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp*. 2011; 6 (47).
- Erdos,EG. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension* 1990; 16 (4) 363-370.
- Erdos,EG and SLOANE,EM. An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykinin and kallidins. *Biochem Pharmacol* 1962; 11 585-592.
- Fagan,SC; Hess,DC; Hohndel,EJ; Pollock,DM, and Ergul,A. Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35 (9) 2220-2225.
- Falk,E; Shah,PK, and Fuster,V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92 (3) 657-671.
- Faustino,JV; Wang,X; Johnson,CE; Klivanov,A; Derugin,N; Wendland,MF, and Vexler,ZS. Microglial cells contribute to endogenous brain defenses after acute neonatal focal stroke. *J Neurosci* 2011; 31 (36) 12992-13001.
- Feigin,VL; Forouzanfar,MH; Krishnamurthi,R; Mensah,GA; Connor,M; Bennett,DA; Moran,AE; Sacco,RL; Anderson,L; Truelsen,T; O'Donnell,M; Venketasubramanian,N; Barker-Collo,S; Lawes,CM; Wang,W; Shinohara,Y; Witt,E; Ezzati,M; Naghavi,M, and Murray,C. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2014; 383 (9913) 245-254.
- Fernandes,ES; Passos,GF; Campos,MM; de Souza,GE; Fittipaldi,JF; Pesquero,JL; Teixeira,MM, and Calixto,JB. Cytokines and neutrophils as important mediators of platelet-activating factor-induced kinin B1 receptor expression. *Br J Pharmacol* 2005; 146 (2) 209-216.
- Figuroa,CD; Marchant,A; Novoa,U; Forstermann,U; Jarnagin,K; Scholkens,B, and Muller-Esterl,W. Differential Distribution of Bradykinin B(2) Receptors in the Rat and Human Cardiovascular System. *Hypertension* 2001; 37 (1) 110-120.
- Finch,CE; Laping,NJ; Morgan,TE; Nichols,NR, and Pasinetti,GM. TGF-beta 1 is an organizer of responses to neurodegeneration. *J Cell Biochem* 1993; 53 (4) 314-322.
- Folts,J. An in vivo model of experimental arterial stenosis, intimal damage, and periodic thrombosis. *Circulation* 1991; 83 (6 Suppl) IV3-14.

- Folts,JD; Crowell,EB, Jr., and Rowe,GG. Platelet aggregation in partially obstructed vessels and its elimination with aspirin. *Circulation* 1976; 54 (3) 365-370.
- Formica,F; Avalli,L; Colagrande,L; Ferro,O; Greco,G; Maggioni,E, and Paolini,G. Extracorporeal membrane oxygenation to support adult patients with cardiac failure: predictive factors of 30-day mortality. *Interact. Cardiovasc Thorac Surg* 2010; 10 (5) 721-726.
- Foster-Goldman,A and McCarthy,D. Angioedema from recombinant TPA administration: case report and pathophysiology review. *Am J Ther* 2013; 20 (6) 691-693.
- Franceschini,R; Gandolfo,C; Cataldi,A; Del,SM; Rolandi,A; Corsini,G; Rolandi,E, and Barreca,T. Twenty-four-hour endothelin-1 secretory pattern in stroke patients. *Biomed Pharmacother* 2001; 55 (5) 272-276.
- Fuchs,TA; Brill,A; Duerschmied,D; Schatzberg,D; Monestier,M; Myers,DD, Jr.; Wroblewski,SK; Wakefield,TW; Hartwig,JH, and Wagner,DD. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107 (36) 15880-15885.
- Fuhrer,G; Gallimore,MJ; Heller,W, and Hoffmeister,HE. *FXII. Blut* 1990; 61 (5) 258-266.
- Fujikawa,K and Asakai,R. [Protein and gene structures of the contact factors and their abnormalities]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 1988; 33 (5) 976-983.
- Fujikawa,K and McMullen,BA. Amino acid sequence of human beta-factor XIIa. *J Biol Chem* 1983; 258 (18) 10924-10933.
- Gailani,D and Broze,GJ, Jr. Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. *Science* 1991; 253 (5022) 909-912.
- Gailani,D and Renné,T. The intrinsic pathway of coagulation: a target for treating thromboembolic disease? *J Thromb Haemost.* 2007; 5 (6) 1106-1112.
- Gailani,D; Sun,MF, and Sun,Y. A comparison of murine and human factor XI. *Blood* 1997; 90 (3) 1055-1064.
- Gallin,JI and Kaplan,AP. Mononuclear cell chemotactic activity of kallikrein and plasminogen activator and its inhibition by C1 inhibitor and alpha 2-macroglobulin. *J Immunol* 1974; 113 (6) 1928-1934.
- Gary,DS; Bruce-Keller,AJ; Kindy,MS, and Mattson,MP. Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J Cereb. Blood Flow Metab* 1998; 18 (12) 1283-1287.
- Garcia, JH; Liu, KF; Yoshida, Y; Chen, S; Lian, J. Brain microvessels: factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery (Wistar rat). *Am J Pathol.* 1994;145 728-740.
- Gasche,Y and Copin,JC. [Blood-brain barrier pathophysiology and ischaemic brain oedema]. *Ann Fr Anesth. Reanim.* 2003; 22 (4) 312-319.
- Gawaz,MP; Loftus,JC; Bajt,ML; Frojmovic,MM; Plow,EF, and Ginsberg,MH. Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest* 1991; 88 (4) 1128-1134.
- Geiser, T; Sturzenegger, M; Genewein, U; Haerberli, A; Beer JH. Mechanisms of cerebrovascular events as assessed by procoagulant activity, cerebral microemboli, and platelet microparticles in patients with prosthetic heart valves. *Stroke.* 1998;29 (9) 1770-7.
- Gettins,PG. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 2002; 102 (12) 4751-4804.
- Ghebrehiwet,B; Randazzo,BP; Dunn,JT; Silverberg,M, and Kaplan,AP. Mechanisms of activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J Clin Invest* 1983; 71 (5) 1450-1456.
- Ghebrehiwet,B; Silverberg,M, and Kaplan,AP. Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J Exp Med* 1981; 153 (3) 665-676.
- Gimbrone,MA, Jr.; Cybulsky,MI; Kume,N; Collins,T, and Resnick,N. Vascular endothelium. An integrator of pathophysiological stimuli in atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1995; 748 122-131.
- Ginsberg,MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 2008; 55 (3) 363-389.
- Girey,GJ; Talamo,RC, and Colman,RW. The kinetics of the release of bradykinin by kallikrein in normal human plasma. *J Lab Clin Med* 1972; 80 (4) 496-505.
- Girolami,A; Randi,ML; Gavasso,S; Lombardi,AM, and Spiezia,F. The occasional venous thromboses seen in patients with severe (homozygous) FXII deficiency are probably due to associated risk factors: a study of prevalence in 21 patients and review of the literature. *J Thromb Thrombolysis* 2004; 17 (2) 139-143.
- Gitel, SN; Wessler, S. The antithrombotic effects of warfarin and heparin following infusions of tissue thromboplastin in rabbits: clinical implications. *J Lab Clin Med* 1979; 94, 481-8.
- Glagov,S; Weisenberg,E; Zarins,CK; Stankunavicius,R, and Koletis,GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl. J Med* 1987; 316 (22) 1371-1375.
- Glagov,S; Zarins,C; Giddens,DP, and Ku,DN. Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112 (10) 1018-1031.
- Go,AS; Hylek,EM; Phillips,KA; Chang,Y; Henault,LE; Selby,JV, and Singer,DE. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA* 2001; 285 (18) 2370-2375.
- Go,AS; Mozaffarian,D; Roger,VL; Benjamin,EJ; Berry,JD; Blaha,MJ; Dai,S; Ford,ES; Fox,CS; Franco,S; Fullerton,HJ; Gillespie,C; Hailpern,SM; Heit,JA; Howard,VJ; Huffman,MD; Judd,SE; Kissela,BM; Kittner,SJ; Lackland,DT; Lichtman,JH; Lisabeth,LD; Mackey,RH; Magid,DJ; Marcus,GM; Marelli,A; Matchar,DB; McGuire,DK; Mohler,ER, III; Moy,CS;

- Mussolino,ME; Neumar,RW; Nichol,G; Pandey,DK; Paynter,NP; Reeves,MJ; Sorlie,PD; Stein,J; Towfighi,A; Turan,TN; Virani,SS; Wong,ND; Woo,D, and Turner,MB. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2014; 129 (3) e28-e292.
- Golas,A; Yeh,CH; Siedlecki,CA, and Vogler,EA. Amidolytic, procoagulant, and activation-suppressing proteins produced by contact activation of blood factor XII in buffer solution. *Biomaterials* 2011; 32 (36) 9747-9757.
- Goldsmith,GH, Jr.; Saito,H, and Ratnoff,OS. The activation of plasminogen by Hageman factor (Factor XII) and Hageman factor fragments. *J Clin Invest* 1978; 62 (1) 54-60.
- Goldstein,JL and Brown,MS. Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism* 1977; 26 (11) 1257-1275.
- Gorlinger,K; Bergmann,L, and Dirkmann,D. Coagulation management in patients undergoing mechanical circulatory support. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2012; 26 (2) 179-198.
- Griffin,JH. Role of surface in surface-dependent activation of Hageman factor (blood coagulation factor XII). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75 (4) 1998-2002.
- Griffin,JH and Cochrane,CG. Mechanisms for the involvement of high molecular weight kininogen in surface-dependent reactions of Hageman factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73 (8) 2554-2558.
- Griffin,JH; Zlokovic,BV, and Mosnier,LO. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *Int J Hematol* 2012; 95 (4) 333-345.
- Groom,RC; Quinn,RD; Lennon,P; Donegan,DJ; Braxton,JH; Kramer,RS; Weldner,PW; Russo,L; Blank,SD; Christie,AA; Taenzer,AH; Forest,RJ; Clark,C; Welch,J; Ross,CS; O'Connor,GT, and Likosky,DS. Detection and elimination of microemboli related to cardiopulmonary bypass. *Circ Cardiovasc Qual. Outcomes* 2009; 2 (3) 191-198.
- Grosse-Siestrup,C; Krautzberger,W, and Bucherl,ES. Arterio-venous shunt with percutaneous leads in calves for long-term in vivo testing of blood-contact materials. *J Biomed Mater Res* 1979; 13 (1) 15-22.
- Grundt,H; Nilsen,DW; Hetland,O; Valente,E, and Fagertun,HE. Activated factor 12 (FXIIa) predicts recurrent coronary events after an acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2004; 147 (2) 260-266.
- Guo,Z; Bussard,KM; Chatterjee,K; Miller,R; Vogler,EA, and Siedlecki,CA. Mathematical modeling of material-induced blood plasma coagulation. *Biomaterials* 2006; 27 (5) 796-806.
- Gursoy-Ozdemir,Y; Yemisci,M, and Dalkara,T. Microvascular protection is essential for successful neuroprotection in stroke. *J Neurochem.* 2012; 123 Suppl 2 2-11.
- Hacke, W; Kaste,M; Bluhmki,E; Brozman,M; D'avalos,A; Guidetti,D; Larrue,V; Lees,KR; Medeghri,Z; Machnig,T; Schneider,D; von Kummer,R;Wahlgren,N and Toni,D. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 h after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2008; 359, 1317-1329.
- Hagedorn,I; Schmidbauer,S; Pleines,I; Kleinschnitz,C; Kronthaler,U; Stoll,G; Dickneite,G, and Nieswandt,B. Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin Infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding. *Circulation* 2010; 121 (13) 1510-1517.
- Halbmayer,WM; Haushofer,A; Schon,R; Mannhalter,C; Strohmer,E; Baumgarten,K, and Fischer,M. The prevalence of moderate and severe FXII (Hageman factor) deficiency among the normal population: evaluation of the incidence of FXII deficiency among 300 healthy blood donors. *Thromb Haemost.* 1994; 71 (1) 68-72.
- Halbmayer,WM; Mannhalter,C; Feichtinger,C; Rubi,K, and Fischer,M. The prevalence of factor XII deficiency in 103 orally anticoagulated outpatients suffering from recurrent venous and/or arterial thromboembolism. *Thromb Haemost.* 1992; 68 (3) 285-290.
- Hall,MJ; Levant,S, and DeFrances,CJ. Hospitalization for stroke in U.S. hospitals, 1989-2009. *NCHS. Data Brief.* 2012; (95) 1-8.
- Hanisch,UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 2002; 40 (2) 140-155.
- Hankey, GJ. Long-term outcome after ischaemic stroke/transient ischaemic attack. *Cerebrovasc Dis.* 2003;16 Suppl 1:14-9.
- Hara,H; Huang,PL; Panahian,N; Fishman,MC, and Moskowitz,MA. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb. Blood Flow Metab* 1996; 16 (4) 605-611.
- Hayek, T; Oiknine, J; Brook, JG; Aviram M. Increased plasma and lipoprotein lipid peroxidation in apo E-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;201 (3) 1567-74.
- Herwald,H; Morgelin,M; Olsen,A; Rhen,M; Dahlback,B; Muller-Esterl,W, and Bjorck,L. Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces--a clue to serious complications in infectious diseases. *Nat Med* 1998; 4 (3) 298-302.
- Hill,GR; Cooke,KR; Brinson,YS; Bungard,D, and Ferrara,JL. Pretransplant chemotherapy reduces inflammatory cytokine production and acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 1999; 67 (11) 1478-1480.
- Hoffman,GM. Neurologic monitoring on cardiopulmonary bypass: what are we obligated to do? *Ann Thorac Surg* 2006; 81 (6) S2373-S2380.
- Hojima,Y; Pierce,JV, and Pisano,JJ. Plant inhibitors of serine proteinases: Hageman factor fragment, kallikreins, plasmin, thrombin, factor Xa, trypsin, and chymotrypsin. *Thromb Res* 1980; 20 (2) 163-171.

- Hojima,Y; Pierce,JV, and Pisano,JJ. Pumpkin seed inhibitor of human factor XIIa (activated Hageman factor) and bovine trypsin. *Biochemistry* 1982; 21 (16) 3741-3746.
- Hovinga,JK; Schaller,J; Stricker,H; Willemin,WA; Furlan,M, and Lammle,B. Coagulation factor XII Locarno: the functional defect is caused by the amino acid substitution Arg 353-->Pro leading to loss of a kallikrein cleavage site. *Blood* 1994; 84 (4) 1173-1181.
- Hua,Y; Keep,RF; Hoff,JT, and Xi,G. Brain injury after intracerebral hemorrhage: the role of thrombin and iron. *Stroke* 2007; 38 (2 Suppl) 759-762.
- Huang,J; Upadhyay,UM, and Tamargo,RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 2006; 66 (3) 232-245.
- Hughes,M and Lip,GY. Stroke and thromboembolism in atrial fibrillation: a systematic review of stroke risk factors, risk stratification schema and cost effectiveness data. *Thromb Haemost.* 2008; 99 (2) 295-304.
- Hung, TC; Borovetz, HS; Kormos, RL; Butter, DB; Yie, CL; Pristas, JM; Griffith, BP; Hardesty, RL. Artificial heart. Hemorrhology and transient ischemic attacks. *ASAIO Trans.* 1990; 36 (3) M132-5.
- Iadecola,C and Anrather,J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 2011; 17 (7) 796-808.
- Ihlenfeld,JV and Cooper,SL. Transient in vivo protein adsorption onto polymeric biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1979; 13 (4) 577-591.
- Jackson,SP and Schoenwaelder,SM. Antiplatelet therapy: in search of the 'magic bullet'. *Nat Rev Drug Discov.* 2003; 2 (10) 775-789.
- Januel,JM; Chen,G; Ruffieux,C; Quan,H; Douketis,JD; Crowther,MA; Colin,C; Ghali,WA, and Burnand,B. Symptomatic in-hospital deep vein thrombosis and pulmonary embolism following hip and knee arthroplasty among patients receiving recommended prophylaxis: a systematic review. *JAMA* 2012; 307 (3) 294-303.
- Jaspard,E; Wei,L, and Alhenc-Gelas,F. Differences in the properties and enzymatic specificities of the two active sites of angiotensin I-converting enzyme (kininase II). Studies with bradykinin and other natural peptides. *J Biol Chem* 1993; 268 (13) 9496-9503.
- Joseph,K; Ghebrehiwet,B, and Kaplan,AP. Cytokeratin 1 and gC1qR mediate high molecular weight kininogen binding to endothelial cells. *Clin Immunol* 1999; 92 (3) 246-255.
- Joseph,K; Ghebrehiwet,B; Peerschke,El; Reid,KB, and Kaplan,AP. Identification of the zinc-dependent endothelial cell binding protein for high molecular weight kininogen and factor XII: identity with the receptor that binds to the globular "heads" of C1q (gC1q-R). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93 (16) 8552-8557.
- Jurk,S; Krieg,T, and Eming,S. [Molecular mechanisms of healing]. *Ann Dermatol Venereol.* 2003; 130 (5) 574-580.
- Kannemeier,C; Shibamiya,A; Nakazawa,F; Trusheim,H; Ruppert,C; Markart,P; Song,Y; Tzima,E; Kennerknecht,E; Niepmann,M; von Bruehl,ML; Sedding,D; Massberg,S; Gunther,A; Engelmann,B, and Preissner,KT. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104 (15) 6388-6393.
- Kaplan,AP. Hageman factor-dependent pathways: mechanism of initiation and bradykinin formation. *Fed. Proc* 1983; 42 (14) 3123-3127.
- Kaplan,AP and Austen,KF. A prealbumin activator of prekallikrein. II. Derivation of activators of prekallikrein from active Hageman factor by digestion with plasmin. *J Exp Med* 1971; 133 (4) 696-712.
- Kaplan,AP and Ghebrehiwet,B. The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol* 2010; 47 (13) 2161-2169.
- Kaplan,AP; Ghebrehiwet,B; Silverberg,M, and Sealey,JE. The intrinsic coagulation-kinin pathway, complement cascades, plasma renin-angiotensin system, and their interrelationships. *Crit Rev Immunol* 1981; 3 (1) 75-93.
- Kaplan,AP; Kay,AB, and Austen,KF. A prealbumin activator of prekallikrein. 3. Appearance of chemotactic activity for human neutrophils by the conversion of human prekallikrein to kallikrein. *J Exp Med* 1972; 135 (1) 81-97.
- Kariya,K; Yamauchi,A; Hattori,S; Tsuda,Y, and Okada,Y. The disappearance rate of intraventricular bradykinin in the brain of the conscious rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982; 107 (4) 1461-1466.
- Kato,K; Kanaji,T; Russell,S; Kunicki,TJ; Furihata,K; Kanaji,S; Marchese,P; Reininger,A; Ruggeri,ZM, and Ware,J. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood* 2003; 102 (5) 1701-1707.
- Kerbiriou,DM and Griffin,JH. Human high molecular weight kininogen. Studies of structure-function relationships and of proteolysis of the molecule occurring during contact activation of plasma. *J Biol Chem* 1979; 254 (23) 12020-12027.
- Kim,DE; Kim,JY; Schellingerhout,D; Kim,EJ; Kim,HK; Lee,S; Kim,K; Kwon,IC; Shon,SM; Jeong,SW; Im,SH; Lee,DK; Lee,MM, and Kim,GE. Protease imaging of human atheromata captures molecular information of atherosclerosis, complementing anatomic imaging. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol* 2010; 30 (3) 449-456.
- Kleinegris,MC; Ten Cate-Hoek,AJ, and Ten,CH. Coagulation and the vessel wall in thrombosis and atherosclerosis. *Pol. Arch Med Wewn.* 2012; 122 (11) 557-566.
- Kleinschnitz,C; Kraft,P; Dreykluft,A; Hagedorn,I; Gobel,K; Schuhmann,MK; Langhauser,F; Helluy,X; Schwarz,T; Bittner,S; Mayer,CT; Brede,M; Varallyay,C; Pham,M; Bendszus,M; Jakob,P; Magnus,T; Meuth,SG; Iwakura,Y; Zerneck,A;

- Sparwasser,T; Nieswandt,B; Stoll,G, and Wiendl,H. Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood* 2013; 121 (4) 679-691.
- Kleinschnitz,C and Plesnila,N. [Experimental therapy approaches for ischemic stroke]. *Nervenarzt* 2012; 83 (10) 1275-1281.
- Kleinschnitz,C; Stoll,G; Bendszus,M; Schuh,K; Pauer,HU; Burfeind,P; Renné,C; Gailani,D; Nieswandt,B, and Renné,T. Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J Exp Med* 2006; 203 (3) 513-518.
- Kluft,C; Dooijewaard,G, and Emeis,JJ. Role of the contact system in fibrinolysis. *Semin Thromb Hemost.* 1987; 13 (1) 50-68.
- Konings,J; Govers-Riemslog,JW; Philippou,H; Mutch,NJ; Borissoff,JI; Allan,P; Mohan,S; Tans,G; Ten,CH, and Ariens,RA. Factor XIIa regulates the structure of the fibrin clot independently of thrombin generation through direct interaction with fibrin. *Blood* 2011; 118 (14) 3942-3951.
- Konstantinides,S. [Diagnosis and therapy of pulmonary embolism]. *Vasa* 2006; 35 (3) 135-146.
- Koster, A; Loebe, M; Hansen, R; Potapov, EV; Noon, GP; Kuppe, H; Hetzer, R. Alterations in coagulation after implantation of a pulsatile Novacor LVAD and the axial flow MicroMed DeBakey LVAD. *Ann Thorac Surg* 2000; (70) 533-537.
- Koster,T; Rosendaal,FR; Briet,E, and Vandenbroucke,JP. John Hageman's factor and deep-vein thrombosis: Leiden thrombophilia Study. *Br J Haematol* 1994; 87 (2) 422-424.
- Koutts,J; Walsh,PN; Plow,EF; Fenton,JW; Bouma,BN, and Zimmerman,TS. Active release of human platelet factor VIII-related antigen by adenosine diphosphate, collagen, and thrombin. *J Clin Invest* 1978; 62 (6) 1255-1263.
- Kozłowski,D; Budrejko,S; Raczak,G; Rysz,J, and Banach,M. Anticoagulant prevention in patients with atrial fibrillation: alternatives to vitamin K antagonists. *Curr Pharm Des* 2013; 19 (21) 3816-3826.
- Kraft,P; De Meyer,SF; Kleinschnitz,C. Next-generation antithrombotics in ischemic stroke: preclinical perspective on 'bleeding-free antithrombosis'. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32 (10) 1831-40.
- Kraft,P; Schwarz,T; Pochet,L; Stoll,G, and Kleinschnitz,C. COU254, a specific 3-carboxamide-coumarin inhibitor of coagulation factor XII, does not protect mice from acute ischemic stroke. *Exp Transl. Stroke Med* 2010; 2 (1) 5-
- Kravtsov,DV; Matafonov,A; Tucker,EL; Sun,MF; Walsh,PN; Gruber,A, and Gailani,D. Factor XI contributes to thrombin generation in the absence of factor XII. *Blood* 2009; 114 (2) 452-458.
- Krupinski,J; Kumar,P; Kumar,S, and Kaluza,J. Increased expression of TGF-beta 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans. *Stroke* 1996; 27 (5) 852-857.
- Krupka,J; May, F; Kaspereit,F; Pragst, I; Weimer,T; Kleinschnitz,C; Stoll,G; Dickneite,G; Nolte,M. The coagulation factor XIIa inhibitor rHA-Infestin-4 potently improves outcome after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *JTH* 2013; 11, Issue Supplement s2
- Kubier,A and O'Brien,M. Endogenous anticoagulants. *Top. Companion Anim Med* 2012; 27 (2) 81-87.
- Kuijpers,MJ; van der Meijden, PE; Feijge, MA; Mattheij, NJ; May, F; Govers-Riemslog, J; Meijers, JC; Heemskerk, JW; Renné, T; Cosemans, JM. Factor XII Regulates the Pathological Process of Thrombus Formation on Ruptured Plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 . ATVBABA.114.303315.
- Kuiper,J; van Puijvelde,GH; van Wanrooij,EJ; van,ET; Habets,K; Hauer,AD, and van den Berkel,TJ. Immunomodulation of the inflammatory response in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2007; 18 (5) 521-526.
- Kunz,M; Nussberger,J; Holtmannspotter,M; Bitterling,H; Plesnila,N, and Zausinger,S. Bradykinin in blood and cerebrospinal fluid after acute cerebral lesions: correlations with cerebral edema and intracranial pressure. *J Neurotrauma* 2013; 30 (19) 1638-1644.
- Kurachi,K and Davie,EW. Activation of human factor XI (plasma thromboplastin antecedent) by factor XIIa (activated Hageman factor). *Biochemistry* 1977; 16 (26) 5831-5839.
- Kyrle,PA and Eichinger,S. Deep vein thrombosis. *Lancet* 2005; 365 (9465) 1163-1174.
- Lambertsen,KL; Biber,K, and Finsen,B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J Cereb. Blood Flow Metab* 2012; 32 (9) 1677-1698.
- Lambertsen,KL; Clausen,BH; Babcock,AA; Gregersen,R; Fenger,C; Nielsen,HH; Haugaard,LS; Wrenfeldt,M; Nielsen,M; Dagnaes-Hansen,F; Bluethmann,H; Faergeman,NJ; Meldgaard,M; Deierborg,T, and Finsen,B. Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J Neurosci* 2009; 29 (5) 1319-1330.
- Lambertsen,KL; Meldgaard,M; Ladeby,R, and Finsen,B. A quantitative study of microglial-macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb. Blood Flow Metab* 2005; 25 (1) 119-135.
- Lane,DA and Caso,R. Antithrombin: structure, genomic organization, function and inherited deficiency. *Baillieres Clin Haematol* 1989; 2 (4) 961-998.
- Langhauser,F; Gob,E; Kraft,P; Geis,C; Schmitt,J; Brede,M; Gobel,K; Helluy,X; Pham,M; Bendszus,M; Jakob,P; Stoll,G; Meuth,SG; Nieswandt,B; McCrae,KR, and Kleinschnitz,C. Kininogen deficiency protects from ischemic neurodegeneration in mice by reducing thrombosis, blood-brain barrier damage, and inflammation. *Blood* 2012; 120 (19) 4082-4092.

- Larsson,M; Rayzman,V; Nolte,MW; Nickel,KF; Bjorkqvist,J; Jamsa,A; Hardy,MP; Fries,M; Schmidbauer,S; Hedenqvist,P; Broome,M; Pragst,I; Dickneite,G; Wilson,MJ; Nash,AD; Panousis,C, and Renné,T. A Factor XIIa Inhibitory Antibody Provides Thromboprotection in Extracorporeal Circulation Without Increasing Bleeding Risk. *Sci Transl. Med* 2014; 6 (222) 222ra17-
- LaRusch,GA; Mahdi,F; Shariat-Madar,Z; Adams,G; Sitrin,RG; Zhang,WM; McCrae,KR, and Schmaier,AH. Factor XII stimulates ERK1/2 and Akt through uPAR, integrins, and the EGFR to initiate angiogenesis. *Blood* 2010; 115 (24) 5111-5120.
- Latacha,MP; Schaiff,WT; Eisenberg,PR, and Abendschein,DR. Factor XII-dependent increases in thrombin activity induce carboxypeptidase-mediated attenuation of pharmacological fibrinolysis. *J Thromb Haemost.* 2004; 2 (1) 128-134.
- Leeb-Lundberg,LM; Marceau,F; Muller-Esterl,W; Pettibone,DJ, and Zuraw,BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 2005; 57 (1) 27-77.
- Leung,JW; Chung,SS, and Chung,SK. Endothelial endothelin-1 over-expression using receptor tyrosine kinase tie-1 promoter leads to more severe vascular permeability and blood brain barrier breakdown after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 2009; 1266 121-129.
- Levy,JH and Tanaka,KA. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 2003; 75 (2) S715-S720.
- Lippi, G; Franchini, M; Targher G. Arterial thrombus formation in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2011; 8 (9) 502-12.
- Liu,F; Schafer,DP, and McCullough,LD. TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods* 2009; 179 (1) 1-8.
- Livak,KJ and Schmittgen,TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25 (4) 402-408.
- López, JA; Kearon, C; Lee, AY. Deep venous thrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004;439-56.
- Lorand,L. Factor XIII: structure, activation, and interactions with Fibrin(-ogen) and fibrin. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 936 291-311.
- Love,S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol* 1999; 9 (1) 119-131.
- Luheshi,NM; Kovacs,KJ; Lopez-Castejon,G; Brough,D, and Denes,A. Interleukin-1alpha expression precedes IL-1beta after ischemic brain injury and is localised to areas of focal neuronal loss and penumbral tissues. *J Neuroinflammation* 2011; 8 186-
- Luporsi,P; Chopard,R; Janin,S; Racadot,E; Bernard,Y; Ecarnot,F; Seronde,MF; Briand,F; Guignier,A; Descotes-Genon,V; Meneveau,N, and Schiele,F. Use of recombinant factor VIIa (NovoSeven((R))) in 8 patients with ongoing life-threatening bleeding treated with fondaparinux. *Acute. Card Care* 2011; 13 (2) 93-98.
- Maas,C; Govers-Riemsdijk,JW; Bouma,B; Schiks,B; Hazenberg,BP; Lokhorst,HM; Hammarstrom,P; Ten,CH; de Groot,PG; Bouma,BN, and Gebbink,MF. Misfolded proteins activate factor XII in humans, leading to kallikrein formation without initiating coagulation. *J Clin Invest* 2008; 118 (9) 3208-3218.
- Maas,C; Oschatz,C, and Renné,T. The plasma contact system 2.0. *Semin Thromb Hemost.* 2011; 37 (4) 375-381.
- MacQuarrie,JL; Stafford,AR; Yau,JW; Leslie,BA; Vu,TT; Fredenburgh,JC, and Weitz,JI. Histidine-rich glycoprotein binds factor XIIa with high affinity and inhibits contact-initiated coagulation. *Blood* 2011; 117 (15) 4134-4141.
- Macrae,IM; Robinson,MJ; Graham,DI; Reid,JL, and McCulloch,J. Endothelin-1-induced reductions in cerebral blood flow: dose dependency, time course, and neuropathological consequences. *J Cereb. Blood Flow Metab* 1993; 13 (2) 276-284.
- Mahdi,F; Madar,ZS; Figueroa,CD, and Schmaier,AH. Factor XII interacts with the multiprotein assembly of urokinase plasminogen activator receptor, gC1qR, and cytokeratin 1 on endothelial cell membranes. *Blood* 2002; 99 (10) 3585-3596.
- Mahoney,WC; Hermodson,MA; Jones,B; Powers,DD; Corfman,RS, and Reeck,GR. Amino acid sequence and secondary structural analysis of the corn inhibitor of trypsin and activated Hageman Factor. *J Biol Chem* 1984; 259 (13) 8412-8416.
- Mandle,R, Jr. and Kaplan,AP. Hageman factor substrates. Human plasma prekallikrein: mechanism of activation by Hageman factor and participation in hageman factor-dependent fibrinolysis. *J Biol Chem* 1977; 252 (17) 6097-6104.
- Mandle,RJ; Colman,RW, and Kaplan,AP. Identification of prekallikrein and high-molecular-weight kininogen as a complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73 (11) 4179-4183.
- Mandle,RJ, Jr. and Kaplan,AP. Hageman-factor-dependent fibrinolysis: generation of fibrinolytic activity by the interaction of human activated factor XI and plasminogen. *Blood* 1979; 54 (4) 850-862.
- Mann,KG. Thrombin formation. *Chest* 2003; 124 (3 Suppl) 4S-10S.
- Marasco,SF; Lukas,G; McDonald,M; McMillan,J, and Ihle,B. Review of ECMO (extra corporeal membrane oxygenation) support in critically ill adult patients. *Heart Lung Circ.* 2008; 17 Suppl 4 S41-S47.
- Marceau,F. Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology* 1995; 30 (1) 1-26.
- Markwardt,F. Studies on the mechanism of the anticoagulant effect of hirudin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol.* 1956; 229 (4) 389-399.

- Massberg, S; Grahl, L; von Bruehl, ML; Manukyan, D; Pfeiler, S; Goosmann, C; Brinkmann, V; Lorenz, M; Bidzhekov, K; Khandagale, AB; Konrad, I; Kennerknecht, E; Reges, K; Holdenrieder, S; Braun, S; Reinhardt, C; Spannagl, M; Preissner, KT; Engelmann, B. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med.* 2010;16 (8) 887-96.
- Massel, DR and Little, SH. Antiplatelet and anticoagulation for patients with prosthetic heart valves. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 7 CD003464-
- Matafonov, A; Leung, PY; Gailani, AE; Grach, SL; Puy, C; Cheng, Q; Sun, MF; McCarty, OJ; Tucker, EI; Kataoka, H; Renné, T; Morrissey, JH; Gruber, A, and Gailani, D. Factor XII inhibition reduces thrombus formation in a primate thrombosis model. *Blood* 2014;
- Matsuo, Y; Mihara, S; Ninomiya, M, and Fujimoto, M. Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 2001; 32 (9) 2143-2148.
- May F; Krupka, J; Thielmann, I; Schenk, S; Letmade, P; Pragst, I; Weimer, T; Nieswandt, B; Dickneite, G; Nolte, M. The FXIIa inhibitor rHA-Infestin-4 safely protects from arterial and venous thrombosis in rodent and non-rodent species. *JTH* 2013; 11, Issue Supplement s2
- McGhie, AI; McNatt, J; Ezov, N; Cui, K; Mower, LK; Hagay, Y; Buja, LM; Garfinkel, LI; Gorecki, M, and Willerson, JT. Abolition of cyclic flow variations in stenosed, endothelium-injured coronary arteries in nonhuman primates with a peptide fragment (VCL) derived from human plasma von Willebrand factor-glycoprotein Ib binding domain. *Circulation* 1994; 90 (6) 2976-2981.
- McMullen, BA and Fujikawa, K. Amino acid sequence of the heavy chain of human alpha-factor XIIa (activated Hageman factor). *J Biol Chem* 1985; 260 (9) 5328-5341.
- Mehrpour, M; Motamed, MR; Aghaei, M, and Badi, Z. Retrosternal mass: An interesting allergic reaction to intravenous thrombolytic therapy for acute ischemic stroke. *Iran J Neurol* 2013; 12 (3) 114-116.
- Menke, J; Luthje, L; Kastrup, A, and Larsen, J. Thromboembolism in atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2010; 105 (4) 502-510.
- Meuth, SG; Kleinschnitz, C; Broicher, T; Austinat, M; Braeuninger, S; Bittner, S; Fischer, S; Bayliss, DA; Budde, T; Stoll, G, and Wiendl, H. The neuroprotective impact of the leak potassium channel TASK1 on stroke development in mice. *Neurobiol. Dis* 2009; 33 (1) 1-11.
- Miller, DR; Oliveria, SA; Berlowitz, DR; Fincke, BG; Stang, P, and Lillienfeld, DE. Angioedema incidence in US veterans initiating angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Hypertension* 2008; 51 (6) 1624-1630.
- Miller, G; Silverberg, M, and Kaplan, AP. Autoactivatability of human Hageman factor (factor XII). *Biochem Biophys Res Commun.* 1980; 92 (3) 803-810.
- Miller, GJ; Esnouf, MP; Burgess, AI; Cooper, JA, and Mitchell, JP. Risk of coronary heart disease and activation of factor XII in middle-aged men. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol* 1997; 17 (10) 2103-2106.
- Minnema, MC; Ten, CH, and Hack, CE. The role of factor XI in coagulation: a matter of revision. *Semin Thromb Hemost.* 1999; 25 (4) 419-428.
- Mittal, MK and Rabinstein, AA. Anticoagulation-related intracranial hemorrhages. *Curr Atheroscler. Rep.* 2012; 14 (4) 351-359.
- Molina, CA and Alvarez-Sabin, J. Recanalization and reperfusion therapies for acute ischemic stroke. *Cerebrovasc. Dis* 2009; 27 Suppl 1 162-167.
- Monroe, DM and Hoffman, M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol* 2006; 26 (1) 41-48.
- Moon, LD and Fawcett, JW. Reduction in CNS scar formation without concomitant increase in axon regeneration following treatment of adult rat brain with a combination of antibodies to TGFbeta1 and beta2. *Eur J Neurosci* 2001; 14 (10) 1667-1677.
- Moran, PM; Higgins, LS; Cordell, B, and Moser, PC. Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human beta-amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92 (12) 5341-5345.
- Mosesson, MW. Fibrin(-ogen) and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005; 3 (8) 1894-1904.
- Müller, F; Mutch, NJ; Schenk, WA; Smith, SA; Esterl, L; Spronk, HM; Schmidbauer, S; Gahl, WA; Morrissey, JH, and Renné, T. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 2009; 139 (6) 1143-1156.
- Müller, T; Bein, T; Philipp, A; Graf, B; Schmid, C, and Riegger, G. Extracorporeal pulmonary support in severe pulmonary failure in adults: a treatment rediscovered. *Dtsch Arztebl. Int* 2013; 110 (10) 159-166.
- Murphy, GS; Hessel, EA, and Groom, RC. Optimal perfusion during cardiopulmonary bypass: an evidence-based approach. *Anesth. Analg.* 2009; 108 (5) 1394-1417.
- Nagel, S; Papadakis, M; Hoyte, L, and Buchan, AM. Therapeutic hypothermia in experimental models of focal and global cerebral ischemia and intracerebral hemorrhage. *Expert Rev Neurother.* 2008; 8 (8) 1255-1268.
- Naito, K and Fujikawa, K. Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces. *J Biol Chem* 1991; 266 (12) 7353-7358.
- Nakayasu, T and Nagasawa, S. Studies on human kininogens. I. Isolation, characterization, and cleavage by plasma kallikrein of high molecular weight (HMW)-kininogen. *J Biochem* 1979; 85 (1) 249-258.

- Newman,MF; Kirchner,JL; Phillips-Bute,B; Gaver,V; Grocott,H; Jones,RH; Mark,DB; Reves,JG, and Blumenthal,JA. Longitudinal assessment of neurocognitive function after coronary-artery bypass surgery. *N Engl. J Med* 2001; 344 (6) 395-402.
- Nichols,M; Townsend,N; Scarborough,P, and Rayner,M. Trends in age-specific coronary heart disease mortality in the European Union over three decades: 1980-2009. *Eur Heart J* 2013; 34 (39) 3017-3027.
- Nielsen,JD. The incidence of pulmonary embolism during deep vein thrombosis. *Phlebology*. 2013; 28 Suppl 1 29-33.
- Nielsen,VG; Kirklin,JK; Holman,WL; Steenwyk,BL; George,JF; Zhou,F; Parks,DA, and Ellis,TC. Mechanical circulatory device thrombosis: a new paradigm linking hypercoagulation and hypofibrinolysis. *ASAIO J* 2008; 54 (4) 351-358.
- Nieswandt,B; Pleines,I, and Bender,M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2011; 9 Suppl 1 92-104.
- Nieswandt, B; Schulte, V; Zywiets, A; Gratacap, MP; Offermanns S. Costimulation of Gi- and G12/G13-mediated signaling pathways induces integrin alpha IIb beta 3 activation in platelets. *J Biol Chem*. 2002; 277 (42) 39493-8.
- NINDS. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl. J Med* 1995; 333 (24) 1581-1587.
- Nussberger,J; Cugno,M; Amstutz,C; Cicardi,M; Pellacani,A, and Agostoni,A. Plasma bradykinin in angio-oedema. *Lancet* 1998; 351 (9117) 1693-1697.
- Ohtaki,H; Yin,L; Nakamachi,T; Dohi,K; Kudo,Y; Makino,R, and Shioda,S. Expression of tumor necrosis factor alpha in nerve fibers and oligodendrocytes after transient focal ischemia in mice. *Neurosci Lett*. 2004; 368 (2) 162-166.
- Oikonomopoulou,K; Ricklin,D; Ward,PA, and Lambris,JD. Interactions between coagulation and complement--their role in inflammation. *Semin Immunopathol* 2012; 34 (1) 151-165.
- Okada,Y; Copeland,BR; Fitridge,R; Koziol,JA, and del Zoppo,GJ. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 1994; 25 (9) 1847-1853.
- Olson,ST and Bjork,I. Regulation of thrombin activity by antithrombin and heparin. *Semin Thromb Hemost*. 1994; 20 (4) 373-409.
- Ortel,TL. Perioperative management of patients on chronic antithrombotic therapy. *Blood* 2012; 120 (24) 4699-4705.
- Paciaroni,M; Agnelli,G; Micheli,S, and Caso,V. Efficacy and safety of anticoagulant treatment in acute cardioembolic stroke: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Stroke* 2007; 38 (2) 423-430.
- Paden,ML; Conrad,SA; Rycus,PT, and Thiagarajan,RR. Extracorporeal Life Support Organization Registry Report 2012. *ASAIO J* 2013; 59 (3) 202-210.
- Pai,M and Crowther,MA. Neutralization of heparin activity. *Handb. Exp Pharmacol* 2012; (207) 265-277.
- Paparella,D; Yau,TM, and Young,E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac. Surg* 2002; 21 (2) 232-244.
- Patel,S and Celermajer,DS. Assessment of vascular disease using arterial flow mediated dilatation. *Pharmacol Rep*. 2006; 58 Suppl 3-7.
- Pauer,HU; Renné,T; Hemmerlein,B; Legler,T; Fritzlar,S; Adham,I; Muller-Esterl,W; Emons,G; Sancken,U; Engel,W, and Burfeind,P. Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene-a model for contact phase activation in vivo. *Thromb Haemost*. 2004; 92 (3) 503-508.
- Peek,GJ and Firmin,RK. The inflammatory and coagulative response to prolonged extracorporeal membrane oxygenation. *ASAIO J* 1999; 45 (4) 250-263.
- Penz,S; Reininger,AJ; Brandl,R; Goyal,P; Rabie,T; Bernlochner,I; Rother,E; Goetz,C; Engelmann,B; Smethurst,PA; Ouwehand,WH; Farndale,R; Nieswandt,B, and Siess,W. Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *FASEB J* 2005; 19 (8) 898-909.
- Perez,HD; Kelly,E; Chenoweth,D, and Elfman,F. Identification of the C5a des Arg cochemotaxin. *Trans Assoc Am Physicians* 1988; 101 242-249.
- Persson,E; Bak,H, and Olsen,OH. Substitution of valine for leucine 305 in factor VIIa increases the intrinsic enzymatic activity. *J Biol Chem* 2001; 276 (31) 29195-29199.
- Pham,M; Kleinschnitz,C; Helluy,X; Bartsch,AJ; Austinat,M; Behr,VC; Renné,T; Nieswandt,B; Stoll,G, and Bendszus,M. Enhanced cortical reperfusion protects coagulation factor XII-deficient mice from ischemic stroke as revealed by high-field MRI. *Neuroimage*. 2010; 49 (4) 2907-2914.
- Pindur,G; Morsdorf,S; Schenk,JF; Krschek,B; Heinrich,W, and Wenzel,E. The overdosed patient and bleedings with oral anticoagulation. *Semin Thromb Hemost*. 1999; 25 (1) 85-88.
- Pixley,RA; Schapira,M, and Colman,RW. Effect of heparin on the inactivation rate of human activated factor XII by antithrombin III. *Blood* 1985a; 66 (1) 198-203.
- Pixley,RA; Schapira,M, and Colman,RW. The regulation of human factor XIIa by plasma proteinase inhibitors. *J Biol Chem* 1985b; 260 (3) 1723-1729.
- Ponczek,MB; Gailani,D, and Doolittle,RF. Evolution of the contact phase of vertebrate blood coagulation. *J Thromb Haemost*. 2008; 6 (11) 1876-1883.

- Pragst,I; Zeitler,SH; Doerr,B; Kaspereit,FJ; Herzog,E; Dickneite,G, and van,RJ. Reversal of dabigatran anticoagulation by prothrombin complex concentrate (Beriplex P/N) in a rabbit model. *J Thromb Haemost*. 2012; 10 (9) 1841-1848.
- Previtali, E; Bucciarelli, P; Passamonti, SM; Martinelli, I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus*. 2011; (2) 120-38
- Radcliffe,R; Bagdasarian,A; Colman,R, and Nemerson,Y. Activation of bovine factor VII by hageman factor fragments. *Blood* 1977; 50 (4) 611-617.
- Raskob,GE; Silverstein,R; Bratzler,DW; Heit,JA, and White,RH. Surveillance for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: recommendations from a national workshop. *Am J Prev. Med* 2010; 38 (4 Suppl) S502-S509.
- Rasoli,S; Zeinah,M; Athanasiou,T, and Kourliouros,A. Optimal intraoperative anticoagulation strategy in patients undergoing off-pump coronary artery bypass. *Interact. Cardiovasc Thorac Surg* 2012; 14 (5) 629-633.
- Ratnoff,OD. Activation of Hageman factor by L-homocystine. *Science* 1968; 162 (3857) 1007-1009.
- Ratnoff,OD and Colopy,JE. A familial hemorrhagic trait associated with a deficiency of a clot-promoting fraction of plasma. *J Clin Invest* 1955; 34 (4) 602-613.
- Ratnoff,OD and Rosenblum,JM. Role of Hageman factor in the initiation of clotting by glass; evidence that glass frees Hageman factor from inhibition. *Am J Med* 1958; 25 (2) 160-168.
- Rau,JC; Beaulieu,LM; Huntington,JA, and Church,FC. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J Thromb Haemost*. 2007; 5 Suppl 1 102-115.
- Reddigari,SR and Kaplan,AP. Monoclonal antibody to human high-molecular-weight kininogen recognizes its prekallikrein binding site and inhibits its coagulant activity. *Blood* 1989; 74 (2) 695-702.
- Reddigari,SR; Shibayama,Y; Brunnee,T, and Kaplan,AP. Human Hageman factor (factor XII) and high molecular weight kininogen compete for the same binding site on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 1993; 268 (16) 11982-11987.
- Regoli,D and Barabe,J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 1980; 32 (1) 1-46.
- Renné,T; Pozgajova,M; Gruner,S; Schuh,K; Pauer,HU; Burfeind,P; Gailani,D, and Nieswandt,B. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 2005; 202 (2) 271-281.
- Renné,T; Schmaier,AH; Nickel,KF; Blomback,M, and Maas,C. In vivo roles of factor XII. *Blood* 2012; 120 (22) 4296-4303.
- Reul,HM and Akdis,M. Blood pumps for circulatory support. *Perfusion* 2000; 15 (4) 295-311.
- Revak,SD and Cochrane,CG. The relationship of structure and function in human Hageman factor. The association of enzymatic and binding activities with separate regions of the molecule. *J Clin Invest* 1976; 57 (4) 852-860.
- Revak,SD; Cochrane,CG; Bouma,BN, and Griffin,JH. Surface and fluid phase activities of two forms of activated Hageman factor produced during contact activation of plasma. *J Exp Med* 1978; 147 (3) 719-729.
- Revak,SD; Cochrane,CG, and Griffin,JH. The binding and cleavage characteristics of human Hageman factor during contact activation. A comparison of normal plasma with plasmas deficient in factor XI, prekallikrein, or high molecular weight kininogen. *J Clin Invest* 1977; 59 (6) 1167-1175.
- Revak,SD; Cochrane,CG; Johnston,AR, and Hugli,TE. Structural changes accompanying enzymatic activation of human Hageman factor. *J Clin Invest* 1974; 54 (3) 619-627.
- Revenko,AS; Gao,D; Crosby,JR; Bhattacharjee,G; Zhao,C; May,C; Gailani,D; Monia,BP, and MacLeod,AR. Selective depletion of plasma prekallikrein or coagulation factor XII inhibits thrombosis in mice without increased risk of bleeding. *Blood* 2011; 118 (19) 5302-5311.
- Robert,S; Bertolla,C; Masereel,B; Dogne,JM, and Pochet,L. Novel 3-carboxamide-coumarins as potent and selective FXIIa inhibitors. *J Med Chem* 2008; 51 (11) 3077-3080.
- Roger,VL; Go,AS; Lloyd-Jones,DM; Benjamin,EJ; Berry,JD; Borden,WB; Bravata,DM; Dai,S; Ford,ES; Fox,CS; Fullerton,HJ; Gillespie,C; Hailpern,SM; Heit,JA; Howard,VJ; Kissela,BM; Kittner,SJ; Lackland,DT; Lichtman,JH; Lisabeth,LD; Makuc,DM; Marcus,GM; Marelli,A; Matchar,DB; Moy,CS; Mozaffarian,D; Mussolino,ME; Nichol,G; Paynter,NP; Soliman,EZ; Sorlie,PD; Sotoodehnia,N; Turan,TN; Virani,SS; Wong,ND; Woo,D, and Turner,MB. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012; 125 (1) e2-e220.
- Roovers,RC; van Dongen,GA, and van Bergen en Henegouwen PM. Nanobodies in therapeutic applications. *Curr Opin Mol Ther* 2007; 9 (4) 327-335.
- Rosen,ED; Chan,JC; Idusogie,E; Clotman,F; Vlasuk,G; Luther,T; Jalbert,LR; Albrecht,S; Zhong,L; Lissens,A; Schoonjans,L; Moons,L; Collen,D; Castellino,FJ, and Carmeliet,P. Mice lacking factor VII develop normally but suffer fatal perinatal bleeding. *Nature* 1997; 390 (6657) 290-294.
- Ross,R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; 138 (5 Pt 2) S419-S420.
- Rother,E; Brandl,R; Baker,DL; Goyal,P; Gebhard,H; Tigyi,G, and Siess,W. Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* 2003; 108 (6) 741-747.
- Rothwell,PM. The high cost of not funding stroke research: a comparison with heart disease and cancer. *Lancet* 2001; 357 (9268) 1612-1616.

- Rubanyi,GM and Polokoff,MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994; 46 (3) 325-415.
- Sainz,IM; Pixley,RA, and Colman,RW. Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. *Thromb Haemost.* 2007; 98 (1) 77-83.
- Sakr,Y. Heparin-induced thrombocytopenia in the ICU: an overview. *Crit Care* 2011; 15 (2) 211-
- Samuel,M; Pixley,RA; Villanueva,MA; Colman,RW, and Villanueva,GB. Human factor XII (Hageman factor) autoactivation by dextran sulfate. Circular dichroism, fluorescence, and ultraviolet difference spectroscopic studies. *J Biol Chem* 1992; 267 (27) 19691-19697.
- Sanchez,J; Elgue,G; Larsson,R; Nilsson,B, and Olsson,P. Surface-adsorbed Fibrin(-ogen) and fibrin may activate the contact activation system. *Thromb Res* 2008; 122 (2) 257-263.
- Saver,JL. Time is brain--quantified. *Stroke* 2006; 37 (1) 263-266.
- Saw,J. Carotid artery stenting for stroke prevention. *Can J Cardiol* 2014; 30 (1) 22-34.
- Schmaier,AH and McCrae,KR. The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation. *J Thromb Haemost.* 2007; 5 (12) 2323-2329.
- Sealey,JE; Atlas,SA; Laragh,JH; Silverberg,M, and Kaplan,AP. Initiation of plasma prorenin activation by Hageman factor-dependent conversion of plasma prekallikrein to kallikrein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76 (11) 5914-5918.
- Sehara,Y; Hayashi,T; Deguchi,K; Zhang,H; Tsuchiya,A; Yamashita,T; Lukic,V; Nagai,M; Kamiya,T, and Abe,K. Decreased focal inflammatory response by G-CSF may improve stroke outcome after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Res* 2007; 85 (10) 2167-2174.
- Shah,IM; Macrae,IM, and Di,NM. Neuroinflammation and neuroprotective strategies in acute ischaemic stroke - from bench to bedside. *Curr Mol Med* 2009; 9 (3) 336-354.
- Siddiqui,TI; Kumar,KSA, and Dikshit,DK. Platelets and atherothrombosis: causes, targets and treatments for thrombosis. *Curr Med Chem* 2013; 20 (22) 2779-2797.
- Silverberg,M; Nicoll,JE, and Kaplan,AP. The mechanism by which the light chain of cleaved HMW-kininogen augments the activation of prekallikrein, factor XI and Hageman factor. *Thromb Res* 1980; 20 (2) 173-189.
- Skalen,K; Gustafsson,M; Rydberg,EK; Hulten,LM; Wiklund,O; Innerarity,TL, and Boren,J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* 2002; 417 (6890) 750-754.
- Slater,JP; Guarino,T; Stack,J; Vinod,K; Bustami,RT; Brown,JM, III; Rodriguez,AL; Magovern,CJ; Zaubler,T; Freundlich,K, and Parr,GV. Cerebral oxygen desaturation predicts cognitive decline and longer hospital stay after cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2009; 87 (1) 36-44.
- Sniecinski,RM and Chandler,WL. Activation of the hemostatic system during cardiopulmonary bypass. *Anesth. Analg.* 2011; 113 (6) 1319-1333.
- Stary,HC; Chandler,AB; Dinsmore,RE; Fuster,V; Glagov,S; Insull,W, Jr.; Rosenfeld,ME; Schwartz,CJ; Wagner,WD, and Wissler,RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol* 1995; 15 (9) 1512-1531.
- Stavrou,E and Schmaier,AH. Factor XII: what does it contribute to our understanding of the physiology and pathophysiology of hemostasis & thrombosis. *Thromb Res* 2010; 125 (3) 210-215.
- Stoll,G; Kleinschnitz,C, and Nieswandt,B. Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood* 2008; 112 (9) 3555-3562.
- Summers,WC. A simple method for extraction of RNA from *E. coli* utilizing diethyl pyrocarbonate. *Anal Biochem* 1970; 33 (2) 459-463.
- Tait,JF and Fujikawa,K. Primary structure requirements for the binding of human high molecular weight kininogen to plasma prekallikrein and factor XI. *J Biol Chem* 1987; 262 (24) 11651-11656.
- Tankersley,DL and Finlayson,JS. Kinetics of activation and autoactivation of human factor XII. *Biochemistry* 1984; 23 (2) 273-279.
- Tans,G; Janssen-Claessen,T; Rosing,J, and Griffin,JH. Studies on the effect of serine protease inhibitors on activated contact factors. Application in amidolytic assays for factor XIIa, plasma kallikrein and factor XIa. *Eur J Biochem* 1987; 164 (3) 637-642.
- Taylor,SL; Wahl-Jensen,V; Copeland,AM; Jahrling,PB, and Schmaljohn,CS. Endothelial cell permeability during hantavirus infection involves factor XII-dependent increased activation of the kallikrein-kinin system. *PLoS Pathog.* 2013; 9 (7) e1003470.
- Thoenissen, NH; Allroggen,A; Ritter, M; Dittrich, R; Schmid, C; Schmid, HH; Ringelstein, EB; Nabavi, DG. Influence of inflammation and pump dynamic on cerebral microembolization in patients with Continuous-Flow DeBakey LVAD. *ASAIO J.* 2006; 52 (3) 243-7.
- Thompson,RE; Mandle,R, Jr., and Kaplan,AP. Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma. *J Clin Invest* 1977; 60 (6) 1376-1380.

- Thompson,RE; Mandle,R, Jr., and Kaplan,AP. Studies of binding of prekallikrein and Factor XI to high molecular weight kininogen and its light chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76 (10) 4862-4866.
- Tirado,I; Soria,JM; Mateo,J; Oliver,A; Souto,JC; Santamaria,A; Felices,R; Borrell,M, and Fontcuberta,J. Association after linkage analysis indicates that homozygosity for the 46C-->T polymorphism in the F12 gene is a genetic risk factor for venous thrombosis. *Thromb Haemost.* 2004; 91 (5) 899-904.
- Touzani,O; Boutin,H; Chuquet,J, and Rothwell,N. Potential mechanisms of interleukin-1 involvement in cerebral ischaemia. *J Neuroimmunol* 1999; 100 (1-2) 203-215.
- Triplett,DA. Coagulation and bleeding disorders: review and update. *Clin Chem* 2000; 46 (8 Pt 2) 1260-1269.
- Ulmer,JS; Lindquist,RN; Dennis,MS, and Lazarus,RA. Ecotin is a potent inhibitor of the contact system proteases factor XIIa and plasma kallikrein. *FEBS Lett.* 1995; 365 (2-3) 159-163.
- Vale,BH and Greer,RT. Ex vivo shunt testing of hydrogel-silicone rubber composite materials. *J Biomed Mater Res* 1982; 16 (4) 471-500.
- van der Meijden,PE; Munnix,IC; Auger,JM; Govers-Riemslog,JW; Cosemans,JM; Kuijpers,MJ; Spronk,HM; Watson,SP; Renné,T, and Heemskerk,JW. Dual role of collagen in factor XII-dependent thrombus formation. *Blood* 2009; 114 (4) 881-890.
- Vermeer,SE; Longstreth,WT, Jr., and Koudstaal,PJ. Silent brain infarcts: a systematic review. *Lancet Neurol* 2007; 6 (7) 611-619.
- Virmani,R; Burke,AP; Farb,A, and Kolodgie,FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll. Cardiol* 2006; 47 (8 Suppl) C13-C18.
- Vitkovic,L; Konsman,JP; Bockaert,J; Dantzer,R; Homburger,V, and Jacque,C. Cytokine signals propagate through the brain. *Mol Psychiatry* 2000; 5 (6) 604-615.
- Vogler,EA and Siedlecki,CA. Contact activation of blood-plasma coagulation. *Biomaterials* 2009; 30 (10) 1857-1869.
- Volpe,M and Cosentino,F. Abnormalities of endothelial function in the pathogenesis of stroke: the importance of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35 (4 Suppl 2) S45-S48.
- von Brühl,ML; Stark,K; Steinhart,A; Chandraratne,S; Konrad,I; Lorenz,M; Khandoga,A; Tirniceriu,A; Coletti,R; Kollnberger,M; Byrne,RA; Laitinen,I; Walch,A; Brill,A; Pfeiler,S; Manukyan,D; Braun,S; Lange,P; Riegger,J; Ware,J; Eckart,A; Haidari,S; Rudelius,M; Schulz,C; Echter,K; Brinkmann,V; Schwaiger,M; Preissner,KT; Wagner,DD; Mackman,N; Engelmann,B, and Massberg,S. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* 2012; 209 (4) 819-835.
- von dem Borne,PA; Meijers,JC, and Bouma,BN. Feedback activation of factor XI by thrombin in plasma results in additional formation of thrombin that protects fibrin clots from fibrinolysis. *Blood* 1995; 86 (8) 3035-3042.
- von Kanel,R; Willemin,WA; Furlan,M, and Lammle,B. Factor XII clotting activity and antigen levels in patients with thromboembolic disease. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 1992; 3 (5) 555-561.
- von Segesser,LK. Heparin-bonded surfaces in extracorporeal membrane oxygenation for cardiac support. *Ann Thorac Surg* 1996; 61 (1) 330-335.
- von Segesser,LK. Cardiopulmonary support and extracorporeal membrane oxygenation for cardiac assist. *Ann Thorac Surg* 1999; 68 (2) 672-677.
- Vorchheimer,DA and Becker,R. Platelets in atherothrombosis. *Mayo Clin Proc* 2006; 81 (1) 59-68.
- Vroman,L. Effect of absorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids. *Nature* 1962; 196 476-477.
- Wakefield,TW; Strieter,RM; Wilke,CA; Kadell,AM; Wroblewski,SK; Burdick,MD; Schmidt,R; Kunkel,SL, and Greenfield,LJ. Venous thrombosis-associated inflammation and attenuation with neutralizing antibodies to cytokines and adhesion molecules. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol* 1995; 15 (2) 258-268.
- Wang, C; Pei, A; Chen, J; Yu, H; Sun, ML; Liu, CF; Xu X. A natural coumarin derivative esculetin offers neuroprotection on cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *J Neurochem.* 2012; 121(6):1007-13.
- Wang,X; Cheng,Q; Xu,L; Feuerstein,GZ; Hsu,MY; Smith,PL; Seiffert,DA; Schumacher,WA; Ogletree,ML, and Gailani,D. Effects of factor IX or factor XI deficiency on ferric chloride-induced carotid artery occlusion in mice. *J Thromb Haemost.* 2005; 3 (4) 695-702.
- Wardlaw,JM; del,ZG, and Yamaguchi,T. Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2000; (2) CD000213
- Weimar,C; Weber,C; Wagner,M; Busse,O; Haberl,RL; Lauterbach,KW, and Diener,HC. Management patterns and health care use after intracerebral hemorrhage. a cost-of-illness study from a societal perspective in Germany. *Cerebrovasc. Dis* 2003; 15 (1-2) 29-36.
- Wells,PS; Forgie,MA, and Rodger,MA. Treatment of venous thromboembolism. *JAMA* 2014; 311 (7) 717-728.
- Wiggins,RC; Bouma,BN; Cochrane,CG, and Griffin,JH. Role of high-molecular-weight kininogen in surface-binding and activation of coagulation Factor XI and prekallikrein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74 (10) 4636-4640.
- Wiggins,RC and Cochrane,CC. The autoactivation of rabbit Hageman factor. *J Exp Med* 1979; 150 (5) 1122-1133.
- Wight,TN. The extracellular matrix and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1995; 6 (5) 326-334.

- Wiman,B and Collen,D. Molecular mechanism of physiological fibrinolysis. *Nature* 1978; 272 (5653) 549-550.
- Wojciechowski,P and Brash,JL. The Vroman effect in tube geometry: the influence of flow on protein adsorption measurements. *J Biomater. Sci Polym. Ed* 1991; 2 (3) 203-216.
- Woodruff,RS; Sullenger,B, and Becker,RC. The many faces of the contact pathway and their role in thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 2011; 32 (1) 9-20.
- Woodruff, TM; Thundyil,J; Tang,SC; Sobey,CG; Taylor,SM; Arumugam,TV. Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener.* 2011; 6 (1) 11.
- Wu,D; Meiring,M; Kotze,HF; Deckmyn,H, and Cauwenberghs,N. Inhibition of platelet glycoprotein Ib, glycoprotein IIb/IIIa, or both by monoclonal antibodies prevents arterial thrombosis in baboons. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol* 2002; 22 (2) 323-328.
- Wuillemin,WA; Eldering,E; Citarella,F; de Ruig,CP; Ten,CH, and Hack,CE. Modulation of contact system proteases by glycosaminoglycans. Selective enhancement of the inhibition of factor XIa. *J Biol Chem* 1996; 271 (22) 12913-12918.
- Wuillemin,WA; Minnema,M; Meijers,JC; Roem,D; Eerenberg,AJ; Nuijens,JH; Ten,CH, and Hack,CE. Inactivation of factor XIa in human plasma assessed by measuring factor XIa-protease inhibitor complexes: major role for C1-inhibitor. *Blood* 1995; 85 (6) 1517-1526.
- Yamashita,K; Gerken,U; Vogel,P; Hossmann,K, and Wiessner,C. Biphasic expression of TGF-beta1 mRNA in the rat brain following permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Brain Res* 1999; 836 (1-2) 139-145.
- Yin,L; Ohtaki,H; Nakamachi,T; Dohi,K; Iwai,Y; Funahashi,H; Makino,R, and Shioda,S. Expression of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) following transient cerebral ischemia. *Acta Neurochir. Suppl* 2003; 86 93-96.
- Zeerleder,S. C1-inhibitor: more than a serine protease inhibitor. *Semin Thromb Hemost.* 2011; 37 (4) 362-374.
- Zeerleder,S; Schloesser,M; Redondo,M; Willemin,WA; Engel,W; Furlan,M, and Lammle,B. Reevaluation of the incidence of thromboembolic complications in congenital factor XII deficiency--a study on 73 subjects from 14 Swiss families. *Thromb Haemost.* 1999; 82 (4) 1240-1246.
- Zhang,X; Tan,F; Zhang,Y, and Skidgel,RA. Carboxypeptidase M and kinin B1 receptors interact to facilitate efficient b1 signaling from B2 agonists. *J Biol Chem* 2008; 283 (12) 7994-8004.
- Zhang,Y; Chapman,AM; Plested,M; Jackson,D, and Purroy,F. The Incidence, Prevalence, and Mortality of Stroke in France, Germany, Italy, Spain, the UK, and the US: A Literature Review. *Stroke Res Treat.* 2012; 2012 436125-
- Zhou,X; Robertson,AK; Rudling,M; Parini,P, and Hansson,GK. Lesion development and response to immunization reveal a complex role for CD4 in atherosclerosis. *Circ. Res* 2005; 96 (4) 427-434.
- Zhuo,R; Siedlecki,CA, and Vogler,EA. Autoactivation of blood factor XII at hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Biomaterials* 2006; 27 (24) 4325-4332.
- Ziv,I; Fleminger,G; Djaldetti,R; Achiron,A; Melamed,E, and Sokolovsky,M. Increased plasma endothelin-1 in acute ischemic stroke. *Stroke* 1992; 23 (7) 1014-1016.

8. ANHANG

8.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMA DER INTRINSISCHEN KOAGULATION	8
ABBILDUNG 2: SCHEMA DER EXTRINSISCHEN KOAGULATION	9
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER GERINNUNGSPROZESSE	10
ABBILDUNG 4: FUNKTIONEN VON FXII	14
ABBILDUNG 5: STRUKTURDOMÄNEN VON FXII	16
ABBILDUNG 6: SCHEMA DER KONTAKTPHASENAKTIVIERUNG AN NEGATIV GELADENEN OBERFLÄCHEN	19
ABBILDUNG 7: DIE 10 HÄUFIGSTEN TODESURSACHEN WELTWEIT 2012	34
ABBILDUNG 8: DARSTELLUNG DES AORTENKOMPRESSIONSMODELLS	49
ABBILDUNG 9: DARSTELLUNG DES VENÖSEN THROMBOSEMODELLS	51
ABBILDUNG 10: DAS MURINE A/V SHUNT MODELL	53
ABBILDUNG 11: DAS SIMULTANE THROMBOSEMODELL IM KANINCHEN	57
ABBILDUNG 12: DAS A/V SHUNT-MODELL IM KANINCHEN	59
ABBILDUNG 13: DER CIRCULUS ARTERIOSUS MIT EINGEFÜHRTEM FILAMENT DES MURINEN tMCAO-MODELLS	65
ABBILDUNG 14: VERSUCHSAUFBAU GRIP TEST	68
ABBILDUNG 15: LOKALISATION DER HIRNSCHEIBEN	69
ABBILDUNG 16: SEKTIONIERUNG DER HIRNSCHEIBEN FÜR DIE FIBRINOGEN-BESTIMMUNG	71
ABBILDUNG 17: SEKTIONIERUNG DER HIRNSCHEIBEN FÜR DIE QUANTITATIVE mRNA-BESTIMMUNG	76
ABBILDUNG 18: FXIIa-INHIBITION MITTELS ANTI-FXIIa MAb 3F7 IM AORTENKOMPRESSIONSMODELL	88
ABBILDUNG 19: FXIIa-INHIBITION MITTELS ANTI-FXIIa MAb 3F7 IN EINEM VENÖSEN THROMBOSEMODELL	91
ABBILDUNG 20: WIRKSAMKEIT VON rHA-INTESTIN-4 IM MURINEN A/V SHUNT-MODELL	93
ABBILDUNG 21: WIRKSAMKEIT VON ANTI-FXIIa MAb 3F7 IM MURINEN A/V SHUNT-MODELL	95
ABBILDUNG 22: WIRKSAMKEIT DES ANTI-FXIIa MAb 3F7 IM MODELL DER ARTERIELLEN UND VENÖSEN THROMBOSE IM KANINCHEN	99
ABBILDUNG 23: BLUT- UND PLASMA TESTS ZUR BESTIMMUNG DES GERINNUNGSSTATUS WÄHREND DES SIMULTANEN THROMBOSEMODELLS	101
ABBILDUNG 24: WIRKSAMKEIT DES ANTI-FXIIa MAb 3F7 IM A/V SHUNT-MODELL KANINCHEN	104
ABBILDUNG 25: RESULTATE DES CLOT-RETRAKTIONSTESTS	106
ABBILDUNG 26: VERHALTENSTESTS, INFARKTVOLUMEN UND MORTALITÄT IM MURINEN tMCAO-MODELL NACH PROPHYLAKTISCHER BEHANDLUNG MIT ANTI-FXIIa MAb 3F7 (10 UND 25 MG/KG)	113
ABBILDUNG 27: RELATIVE FIBRIN(-OGEN)-DICHTENACH ZEREBRALER ISCHÄMIE	115
ABBILDUNG 28: VERÄNDERTE mRNA-EXPRESSIONSPROFILE NACH ZEREBRALER ISCHÄMIE	121
ABBILDUNG 29: PLASMA TESTS ZUR EVALUIERUNG DES GERINNUNGSSTATUS 24 H NACH EINLEITUNG DER ISCHÄMIE	123
ABBILDUNG 30: WIRKSAMKEIT DES ANTI-FXIIa MAb 3F7 (50 MG/KG) IN DER ZEREBRALEN ISCHÄMIE	125
ABBILDUNG 31: NEUROLOGISCHE TESTS UND EVALUIERUNG DES TOTALEN INFARKTVOLUMENS	129
ABBILDUNG 32: RELATIVER FIBRIN(-OGEN)-GEHALT NACH ZEREBRALER ISCHÄMIE	131
ABBILDUNG 33: mRNA-EXPRESSIONSPROFILE NACH ZEREBRALER ISCHÄMIE	135
ABBILDUNG 34: PLASMA TESTS ZUR EVALUIERUNG DES GERINNUNGSSTATUS	137

8.2 Publikationsliste

Poster-Präsentationen

Fries M, Krupka J, May F, Kaspereit F, Krege W, Rayzman V, Wilson MJ, Pragst I, Weimer T, Panousis C, Dickneite G, Nolte MW: "Potent antithrombotic effects of two specific FXIIa-inhibitors in a rabbit arteriovenous shunt model". Abstract-CD 58th GTH 2014 (ISSN 2191-5024), Poster P1-2

Dieses Poster wurde durch Dr. Frauke May vorgestellt.

Fries M, Krupka J, Kaspereit F, Krege W, Rayzman V, Wilson MJ, Pragst I, Weimer T, Panousis C, Dickneite G, Nolte MW: "Inhibiting coagulation factor FXIIa potently prevents thrombosis in a rabbit arteriovenous shunt model." ABSTRACTS OF THE XXIV CONGRESS OF THE INTERNATIONAL SOCIETY ON THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2013; 11: 1-1322. doi: 10.1111/jth.12284

Manuskripte

Larsson M, Rayzman V, Nolte MW, Nickel KF, Björkqvist J, Jämsä A, Hardy MP, **Fries M**, Schmidbauer S, Hedenqvist P, Broomé M, Pragst I, Dickneite G, Wilson MJ, Nash AD, Panousis C, Renné T: "A Factor XIIa Inhibitory Antibody Provides Thromboprotection In Extracorporeal Circulation Without Increasing Bleeding Risk." *Sci Transl Med* 2014; 222(6):222-17

Heydenreich N, Nolte MW, Göb E, Langhauser F, **Hofmeister M**, Kraft P, Albert-Weissenberger C, Brede M, Varallyay C, Göbel K, Meuth SG, Nieswandt B, Dickneite G, Stoll G, Kleinschnitz C: "C1-inhibitor protects from brain ischemia-reperfusion injury by combined antiinflammatory and antithrombotic mechanisms." *Stroke*, 2012; 43(9):2457-67.

8.3 Danksagung

Bei der Erstellung dieser Arbeit wurde ich begleitet und unterstützt durch eine Vielzahl von Menschen, bei denen ich mich gerne bedanken möchte.

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Professor G. Dickneite danken für die Überlassung der faszinierenden Thematik der FXIIa-Inhibitoren. Er stand mir mit seinem umfassenden Fachwissen stets zur Seite.

Ebenso wurde ich durch Marc Nolte, PhD, und Dr. Frauke May unermüdlich gefördert und unterstützt, wofür ich mich hier bedanken möchte.

Darüber hinaus danke ich Professor C. Kleinschnitz aus Würzburg für die Möglichkeit das murine experimentelle Schlaganfallmodell zu erlernen und für die selbstverständliche Integration in die Arbeitsgruppe.

Ich danke außerdem Professor B. Nieswandt und Ina Thielmann aus Würzburg für die unkomplizierte Kooperation während des Aortenkompressionsmodells.

Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Pharmakologie und Toxikologie der CSL Behring GmbH, Marburg, möchte ich danken für die Geduld und Freude an der Weitergabe von Wissen, die stetige Unterstützung bei neuen Fragestellungen und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Ich danke genauso den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kleinschnitz, die mich schnell integrierten, für jede Diskussion offen waren und in jeder Hinsicht zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beitrugen.

Meinem Mann danke ich für die Geduld, den Ansporn und den Zuspruch.

Außerdem möchte ich nicht zuletzt meiner Familie danken, die mich jederzeit vorbehaltlos unterstützt.

8.4 Ehrenwörtliche Erklärung

8.5 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Aigner, Aumüller, Bastians, Bauer, Becker, Brehm, Burchert, Cetin, Daut, del Rey, Dickneite, Dietrich, Eickmann, Eilers, Elsässer, Feuser, Fritz, Garten, Glorius, Grzeschik, Hasilik, Hassel, Hilt, Homberg, Huber, Jacob, Jungclas, Kaufmann, Kirchner, Klingenspor, Knöller, Koch, Koolman, Krebber, Lill, Lillig, Liss, Löffler, Lohoff, Lüers, Maisner, Mösch, Moll, Mühlenhoff, Müller, Müller-Brüsselbach, Oeffner, Petz, Plant, Röhm, Röper, Schäfer, Schulze, Seitz, Suske, Voigt, Vollmer, Weihe, Weiser, Westermann, Yu.

8.6 Lebenslauf